

Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln in biologischen Proben mittels Laserablation mit induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Jana Lingott

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Ulrich Panne

2. Prof. Dr. Michael W. Linscheid

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Januar 2016

Abstract

Gadolinium based contrast agents are used for magnetic resonance imaging. After their excretion by medicated patients they reach surface water passing waste water treatment plants where they are not removed sufficiently. The behavior of the contrast agents in the environment and the interaction with organisms was investigated in this work due to the toxicity of the free Gd^{3+} ion and the associated risks, such as accumulation in the human food chain.

In this work, two elemental analytical imaging methods – laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis (SRXRF) – have been used to investigate the uptake, distribution, and excretion of Gd-based contrast agents by various biological systems (filamentous algae, duckweed, cress, water flea). Both methods were analytically characterized and compared for this application.

The detection limits of gadolinium were determined under optimized conditions by LA-ICP-MS and SRXRF. With calibration by remains of dried elemental standard droplets detection limits of 0.78 pg absolute amount of gadolinium (LA-ICP-MS), respectively 89 pg (SRXRF) were reached. Based on filamentous algae as water plants the uptake and the excretion of Gd-based contrast agents were revealed. The dependence on concentration of the contrast agent in the exposition solution and the independence of temporal uptake within one to seven days were studied for duckweed. By LA-ICP-MS gadolinium was quantified in a leaf of cress plant. The verification of the results was performed by SRXRF and ICP-MS after digestion. Furthermore, the uptake and distribution of Gd-based contrast agents in higher organisms (water flea) were observed. The exact location of gadolinium was resolved by three-dimensional μ -computed tomography by the comparison of an exposed with a Gd-free water flea. In all studies, gadolinium was detected in the investigated exposed model organisms. It can be concluded that the contrast agents were taken from the environment.

Kurzzusammenfassung

Gadoliniumbasierte Kontrastmittel werden in der Magnetresonanztomographie verwendet und gelangen nach der Exkretion durch behandelte Patienten in Oberflächengewässer, da sie von Klärwerken nur unzureichend entfernt werden. Das Verhalten der Kontrastmittel in der Umwelt und deren Wechselwirkung mit Organismen wurde in dieser Arbeit aufgrund der Toxizität des freien Gd^{3+} -Ions und der damit verbundenen möglichen Gefahren, wie der Anreicherung in der menschlichen Nahrungskette, näher untersucht.

Dazu wurden zwei bildgebende elementanalytische Methoden – Laserablation mit induktiv gekoppelter Plasmamassenspektrometrie (LA-ICP-MS) und Röntgenfluoreszenzanalyse mit Synchrotronstrahlung (SRXRF) – genutzt, um verschiedene biologische Systeme (Fadenalgen, Wasserlinsen, Kresse, Wasserflöhe) hinsichtlich ihrer Aufnahme, Verteilung und Abgabe von Gd-basierten Kontrastmitteln zu untersuchen. Zuvor wurden beide Methoden für diese Anwendung analytisch charakterisiert und verglichen.

Die Nachweisgrenzen von Gadolinium wurden mittels LA-ICP-MS und mittels SRXRF unter jeweils optimierten Bedingungen bestimmt. Dabei wurden Absolutmengen von 0.78 pg Gd mit der LA-ICP-MS und 89 pg Gd mit der SRXRF durch die Kalibrierung über die Rückstände eingetrockneter Elementstandardtropfen beobachtet. Anhand von Fadenalgen als Wasserpflanzen konnte die Aufnahme und Abgabe der Gd-basierten Kontrastmittel gezeigt werden. Die Abhängigkeit von der Konzentration des Kontrastmittels in der Expositionslösung und die Unabhängigkeit der zeitlichen Aufnahme innerhalb eines Zeitraums von einem bis sieben Tagen wurden an Wasserlinsen studiert. Mittels LA-ICP-MS konnte Gadolinium in einem Kresseblatt quantifiziert werden. Die Verifizierung dieser Ergebnisse erfolgte mit der SRXRF und der ICP-MS nach Aufschluss. Auch die Aufnahme und Abgabe von Gd-basiertem Kontrastmittel in höheren Organismen (Wasserfloh) wurde beobachtet. Die genaue Lokalisierung des Gadoliniums wurde mittels dreidimensionaler μ -Computertomographie durch den Vergleich eines exponierten mit einem unbelasteten Wasserfloh aufgeklärt. In allen Untersuchungen wurde Gadolinium in den exponierten Modellorganismen nachgewiesen, woraus geschlossen werden kann, dass die Kontrastmittel aus der Umgebung aufgenommen werden.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	3
Kurzzusammenfassung	4
Inhaltsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	9
I EINLEITUNG & ZIELSETZUNG.....	12
II GRUNDLAGEN	17
1. Aktueller Kenntnisstand.....	17
1.1 Gd-basierte Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie.....	17
1.1.1 Grundlagen der MRT und Funktionsweise der Kontrastmittel.....	17
1.1.2 Risiken der Anwendung Gd-basierter Kontrastmittel	19
1.1.3 Nephrogene systemische Fibrose	21
1.1.4 Stabilität von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln.....	21
1.2 Verbleib von Gd-basierten Kontrastmitteln in der Umwelt.....	23
1.3 Imaging biologischer Proben	26
2. Methoden.....	30
2.1 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma.....	30
2.1.1 Induktiv gekoppeltes Plasma.....	31
2.1.2 Interface	33
2.1.3 Ionenoptik	34
2.1.4 Massenanalysator.....	34
2.1.5 Detektor.....	36
2.1.6 Probeneintrag	37
2.1.6.1 Flüssigprobeneintrag.....	37
2.1.6.2 Laserablation.....	39
2.1.6.2.1 Interner Standard.....	45
2.1.6.2.2 Quantifizierungskonzepte und Kalibrierung	47
2.2 Röntgenfluoreszenzanalyse mit Synchrotronstrahlung.....	49
2.2.1 Grundprinzip	49
2.2.2 Synchrotronstrahlung.....	51
2.3 Dreidimensionale μ -Computertomographie mit Synchrotronstrahlung.....	54

3. Untersuchte Modellorganismen.....	56
3.1 Wasserpflanzen – Fadenalge – <i>Zygnema</i>	57
3.2 Schwimmpflanzen – Wasserlinse – <i>Lemna minor</i>	57
3.3 Landpflanzen – Kresse – <i>Lepidium sativum</i>	57
3.3.1 Stoff- und Wassertransport in Landpflanzen	58
3.3.1.1 Wassertransport.....	58
3.3.1.2 Transport von Assimilaten	58
3.3.1.3 Exkretion und Sekretion	59
3.3.2 Schutzmechanismus von Pflanzen bei der Aufnahme von Substanzen	59
3.4 Aquatische Fauna – Wasserfloh – <i>Daphnia magna</i>	60
III EXPERIMENTELLER TEIL.....	62
1. Geräte und Chemikalien	62
1.1 LA-ICP-MS.....	62
1.2 ICP-MS mit einem Flüssig-Probeneintragssystem.....	63
1.3 SRXRF und μ -CT	64
1.4 Chemikalien	65
2. Nachweisgrenzen mittels aufgetropfter Standards.....	68
2.1 Nachweisgrenzen mittels LA-ICP-MS	68
2.2 Nachweisgrenzen mittels SRXRF.....	69
3. Wasserpflanzen – Algen (<i>Zygnema</i> & <i>Scenedesmus subspicatus</i>)	70
3.1 Aufnahme und Abgabe eines Kontrastmittels durch Fadenalgen	70
3.2 Zuchtmedium für Algen	70
4. Schwimmpflanzen – Wasserlinsen (<i>Lemna minor</i>)	72
4.1 Nährmedium für Wasserlinsen.....	72
4.2 Konzentrationsabhängige Aufnahme des Kontrastmittels durch Wasserlinsen...	72
4.3 Zeitabhängige Aufnahme des Kontrastmittels durch Wasserlinsen	73
5. Landpflanzen – Kresse (<i>Lepidium sativum</i>)	74
5.1 Kultivierung der Kresse	74
5.1.1 Gesamtbestimmung von Gd nach Aufschluss.....	74
5.1.2 Bestimmung der Gd-Verteilung mittels μ -SRXRF und LA-ICP-MS	75
5.1.3 Bestimmung der Cd- & Gd-Verteilung mittels LA-ICP-MS.....	75

5.1.4 Überprüfung von Iod als internen Standard	76
5.1.5 Untersuchung der Verteilung von essentiellen Elementen.....	76
5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, μ -SRXRF & LA-ICP-MS.....	76
5.2 Standard zum Ausgleich von Variationen des Messsignals	77
5.2.1 Iodierung von Kresseblättern.....	77
5.2.2 Barium	78
5.3 Mikrowellenaufschlüsse von Kresse.....	78
5.4 Reproduzierbarkeit von Tropfen unter Matrixeinfluss.....	79
5.5 Quantifizierung von Gd und Pr in Kresse	79
5.5.1 ICP-MS.....	79
5.5.2 SRXRF	80
5.5.3 LA-ICP-MS.....	80
6. Aquatische Fauna – Wasserflöhe (<i>Daphnia magna</i>).....	81
6.1 Nährmedium für Wasserflöhe	81
6.2 Aufnahme eines Kontrastmittels aus dem umgebenden Medium.....	83
6.3 Aufnahme eines Kontrastmittels über die Nahrung	84
IV ERGEBNISSE & DISKUSSION	85
1. Nachweisgrenzen.....	86
1.1 Nachweisgrenzenbestimmung mittels LA-ICP-MS.....	86
1.2 Nachweisgrenzenbestimmung mittels SRXRF	89
2. Wasserpflanzen – Fadenalgen	93
3. Schwimmpflanzen – Wasserlinsen.....	95
3.1 Konzentrationsabhängige Aufnahme Gd-basierter Kontrastmittel.....	95
3.2 Zeitabhängige Aufnahme Gd-basierter Kontrastmittel	97
4. Landpflanzen – Kresse	100
4.1 Lösungsanalytik nach Aufschluss.....	100
4.2 Verteilung von Gadolinium in Blatt, Stängel & Wurzel.....	102
4.2.1 Messung von Gd in Kressekompartimenten mittels LA-ICP-MS.....	103
4.2.2 Messung von Gd in einem Kresseblattes mittels SRXRF	105
4.3 Verteilung von Cd im Kresseblatt.....	106
4.4 Verteilung von Pr im Kresseblatt	107

4.5 Standard zum Ausgleich von Variationen des Messsignals	109
4.5.1 Essentielle Elemente	110
4.5.2 Iodierung von Kresseblättern.....	112
4.5.3 Barium	115
4.6 Untersuchungen zur matrixangepassten Kalibrierung	118
4.6.1 Reproduzierbarkeit	118
4.6.2 Quantifizierung von Gd und Pr in einem Kresseblatt.....	120
4.6.2.1 Quantifizierung von Gd und Pr im Kresseblatt mittels LA-ICP-MS	120
4.6.2.2 Quantifizierung von Gd und Pr im Kresseblatt mittels SRXRF	122
4.6.2.3 Quantifizierung von Gd und Pr im Kresseblatt mittels ICP-MS	125
5. Aquatische Fauna - Wasserflöhe.....	129
5.1 Aufnahme und Verteilung von Gd-basiertem Kontrastmittel aus dem umgebenden Medium	129
5.1.1 Untersuchung zur Aufnahme von Gd aus dem umgebenden Medium mittels LA-ICP-MS.....	130
5.1.2 Untersuchung zur Aufnahme von Gd aus dem umgebenden Medium mittels 3D μ -CT.....	131
5.2 Aufnahme von Kontrastmitteln über die Nahrung.....	134
V ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK.....	136
VI ANHANG.....	140
1. Abbildungsverzeichnis.....	140
2. Literaturverzeichnis	145
3. Danksagung	161
4. Publikationsliste.....	162
4.1 Veröffentlichungen	162
4.2 Tagungsbeiträge	162
4.2.1 Vorträge.....	163
4.2.2 Poster	163
5. Selbstständigkeitserklärung.....	164

Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
CE	Capillary Electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
cps	Counts per Second (Ereignisse pro Sekunde)
CT	Computertomographie
DCM	Doppel-Kristall-Monochromator
DMM	Doppel-Multilayer-Monochromator
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EC	Elektrochemie
ESA	Elektrostatischer Analysator
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETV	Elektrothermische Verdampfung
Gd-BOPTA	Gadolinium(III)-2-[2-[2-[bis(carboxylatomethyl)amino]ethyl-(carboxylatomethyl)amino] ethyl-(carboxylatomethyl)amino]-3-phenylmethoxypropanoat
Gd-BT-DO3A	Gadolinium(III)-2,2',2''-(10-((2R,3S)-1,3,4-trihydroxybutan-2-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triacetat
Gd-DOTA	Gadolinium(III)-2-[4,7,10-Tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetrazacyclododec-1-yl]essigsäure
Gd-DTPA	Gadolinium(III)-2-[Bis[2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl]amino]essigsäure
Gd-DTPA-BMA	Gadolinium(III)-5,8-bis(carboxylatomethyl)-2-[2-(methylamino)-2-oxoethyl]-10-oxo-2,5,8,11-tetraazadodecan-1-carboxylathydrat
Gd-HP-DO3A	Gadolinium(III)-2-[4,7-bis(carboxylatomethyl)-10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetrazacyclododec-1-yl]acetat
HILIC	Hydrophobic Interaction Liquid Chromatography (Hydrophile Interaktionschromatographie)

HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ICP	Inductively coupled Plasma (Induktiv gekoppeltes Plasma)
IDMS	Isotope Dilution Mass Spectrometry (Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie)
IS	Interner Standard
KM	Kontrastmittel
LA	Laserablation
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LD ₅₀	Letale Dosis für 50 % der Population
LIBS	Laser-induced breakdown spectroscopy (Laserinduzierte Plasmaspektroskopie)
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
Meg	Meglumin
ME-SALDI	Matrix-Enhanced Surface-Assisted Laser Desorption/Ionisation (Matrix-verstärkte Oberflächen-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
MRA	Magnetresonanzangiographie
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonanz (Kernspinresonanz)
OECD	Organisation for Economic Co-Operation and Development
OES	Optische Emissionsspektrometrie
PET	Positronen-Emissionstomographie
RSC	Relativer Empfindlichkeitskoeffizient
RT	Raumtemperatur
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SF	Sektorfeld
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry (Sekundärionenmassenspektrometrie)

SRXRF	Synchrotron-Ray X-Ray Fluorescence (Röntgenfluoreszenzanalyse mit Synchrotronstrahlung)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
ToF	Time of Flight (Flugzeit)
u	Atomare Masseneinheit
UV	Ultraviolett
VIS	Visible (sichtbar)
WC	Woods Hole modified CHU 10
ZRM	Zertifiziertes Referenzmaterial

I EINLEITUNG & ZIELSETZUNG

In der Medizin spielt neben der Röntgendiagnostik die Magnetresonanztomographie (MRT) eine wichtige Rolle. Für die Untersuchung von Strukturveränderungen innerhalb des Körpers sind bildgebende Verfahren nicht mehr wegzudenken. Dafür werden bei MRT-Untersuchungen die Kontraste durch die Verabreichung von Gadolinium in komplexierter Form als Kontrastmitteln (KM) oft künstlich verstärkt. Innerhalb der ersten Dekade (1988 - 1998) der Verwendung von Kontrastmitteln wurden weltweit ca. 33 Millionen MRT-Untersuchungen unter Gabe gadoliniumbasierter Kontrastmittel durchgeführt^[1]. Bis 2005 stiegen die weltweiten Anwendungen bis auf 20 Millionen pro Jahr^[2].

MRT-Kontrastmittel bestehen meist aus einem Gadoliniumion der Oxidationsstufe +III, das von Aminocarboxylaten chelatisiert ist. Sie werden dem Patienten oral oder intravenös verabreicht und über die Niere bzw. die Galle wieder ausgeschieden. So gelangen sie von den Abwässern über Klärwerke^[3] in Oberflächengewässer^[4] und ins Grundwasser^[5].

In komplexierter Form sind die Kontrastmittel unbedenklich und werden innerhalb einiger Stunden unverändert wieder ausgeschieden^[6]. Freie Gadoliniumionen allerdings sind *in vivo* hoch toxisch^[7]. Bei Gehalten von 10-20 µg kg⁻¹ bilden sie unlösliche Partikel, die in der Leber aggregieren und zu einer schnellen hepatischen Nekrose führen können^[7]. Zur chronischen Erkrankung – der sogenannten nephrogenen systemischen Fibrose (NSF) – kann die Gabe gadoliniumhaltiger Kontrastmittel bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion führen. Durch die längere Retentionszeit der Kontrastmittel im Körper können die Kontrastmittel metabolisiert und das toxische Gd³⁺-Ion frei gesetzt werden^[8]. Dieses wird dann in das Weichgewebe und die Knochen eingebaut und verursacht eine starke Gewebevermehrung der Haut und der inneren Organe. Die Krankheit trat bisher nur in Zusammenhang mit den offenkettigen Kontrastmitteln Omniscan®, Magnevist[®]^[9], Optimark[®] oder MultiHance[®] auf, woraufhin die Zulassung für diese Medikamente erheblich eingeschränkt wurde.

Die Wechselwirkung der gadoliniumbasierten Kontrastmittel mit humanem Gewebe ist aufgrund deren Anwendung als Medikament gut untersucht. Während der MRT beeinflusst das Gd die Relaxationszeit der Protonen des Wassers im menschlichen Gewebe. Durch unterschiedliche Wassergehalte in verschiedenen Gewebearten können Kontraste

verstärkt werden. Jedoch ist das Verhalten von Gadolinium in Langzeitstudien und mögliche Metaboliten der Kontrastmittel in der Umwelt noch nicht vollständig aufgeklärt^[10, 11].

Bisher ist bekannt, dass die gadoliniumbasierten Kontrastmittel über die Abwässer in Klärwerke gelangen, wo sie nicht bzw. nur unzureichend eliminiert werden^[12]. Von dort aus werden sie in Oberflächengewässer^[3, 13, 14], Grund-^[5] und Leitungswässer^[15] eingetragen. Die positive Gadolinium-Anomalie^[16], die durch die Anreicherung des Gadoliniums in den Gewässern entsteht, ist nachweislich anthropogenen Ursprungs^[17].

Durch die Gefahren des freien Gadoliniumions sollte der Weg der Kontrastmittel in der Umwelt unbedingt verfolgt werden, denn viele Fragen sind noch offen, wie z. B. Kann das Kontrastmittel durch das Wasser von aquatischen Organismen (Pflanzen und Tiere) aufgenommen werden? Wenn ja, wie verteilt es sich und in welchen Mengen wird es aufgenommen? Wird es angereichert? Gelangt es in die Nahrungskette höherer Lebewesen? Können die Kontrastmittel durch die Bewässerung der Felder mit Grund- oder Oberflächenwasser in die Nutzpflanzen gelangen? Finden Veränderungen am Komplex, wie z. B. eine Transmetallierung statt?

Vermutet wird, dass Kontrastmittel von Tieren, die exponiertes Wasser trinken, ähnlich wie vom Menschen aufgenommen werden kann und innerhalb kurzer Zeit wieder vollständig ausgeschieden wird. Wahrscheinlich verteilen sich Kontrastmittel in Organismen über das Wasser. Von Pflanzen wird angenommen, dass sie Kontrastmittel aufgrund ihres Schutzmechanismus – dem Casparischen Streifen – nicht aufnehmen.

Die Fragen, ob die Kontrastmittel von verschiedenen Lebewesen aufgenommen werden können und in welchen Mengen und Zeiträumen dies geschieht, sollen in dieser Arbeit aufgegriffen und bearbeitet werden. Außerdem sollen für ein besseres Verständnis von der Aufnahme und dem Transportprozess der Kontrastmittel in den Organismen auch deren Verteilungen in den Organismen untersucht werden.

Konventionelle analytische Methoden (AAS, ICP-OES, ICP-MS) können für die Bestimmung von Element- oder Speziesgehalten oder -konzentrationen in Aufschlüssen in größeren Teilen eines Biosystems^[3] genutzt werden. Dabei gehen allerdings die Informationen über die örtliche Elementverteilung im Organismus verloren.

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene bildgebende Verfahren (SRXRF, Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-MS (MALDI-MS)) verwendet, um Methoden zu entwickeln, mit denen die Analytverteilung in biologischem Gewebe untersucht werden kann. Eine vielversprechende neuere Technik dafür ist die Laserablation

(LA) gekoppelt mit der Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)^[18], die in dieser Arbeit als wesentliche Methode zum Einsatz kommt. Die Laserablation bietet als Probeneintragssystem viele Vorteile: Durch den direkten Feststoffeintrag gestaltet sich die Probenvorbereitung einfach und schnell. Durch Laserspotgrößen im unteren μm -Bereich und Laserscangeschwindigkeiten im Bereich von $\mu\text{m s}^{-1}$ sind örtliche Auflösungen auf Zellebene^[19] möglich. Die direkte Analyse von Feststoffen erlaubt eine lösungsmittelfreie Probenvorbereitung, wodurch das Kontaminationsrisiko erheblich sinkt. Auch die Wahrscheinlichkeit der Oxid- und Hydroxidbildung^[20], sowie der Bildung von anderen polyatomaren Interferenzen^[21], ist gegenüber dem Einsatz wässriger Lösungen geringer. Die ICP-MS als Analysesystem bietet die Möglichkeit zur Multielementanalyse und weist einen großen dynamischen Messbereich (bis zu neun Größenordnungen) auf. Die Nachweisgrenzen der LA-ICP-MS liegen im unteren $\mu\text{g kg}^{-1}$ -Bereich^[22]. Diese Methode ist deshalb sehr gut geeignet, um die Aufnahme gadoliniumbasierter Kontrastmittel in biologischen Modellorganismen zu untersuchen.

Neben der LA-ICP-MS sind die Röntgenfluoreszenzanalyse mit Synchrotronstrahlung (SRXRF) und die μ -Computertomographie (μ -CT) bildgebende Verfahren, die in dieser Arbeit genutzt wurden, um die Ergebnisse der LA-ICP-MS zu verifizieren bzw. zu ergänzen. Beide Verfahren sind dafür besonders gut geeignet, da sie die Möglichkeit bieten zerstörungsfrei messen zu können^[23] und so dieselbe Probe nacheinander mit der SRXRF oder der μ -CT und anschließend mit der LA-ICP-MS untersucht werden kann^[24].

Für die Quantifizierung mittels LA-ICP-MS werden Kalibriermethoden mit geeigneten matrixangepassten Standards benötigt^[25], da Matrixeffekte und Elementfraktionierungseffekte^[26] das Analytsignal im Vergleich zu Standards verändern können. In einem Review diskutieren Hare *et al.*^[25] verschiedene Quantifizierungskonzepte, die auf einer „matrixangepassten“ Kalibrierung basieren. Bisher gibt es allerdings nicht für alle Anwendungen geeignete matrixangepasste Kalibrierstandards bzw. Referenzmaterialien. Besonders schwierig ist es, ein Referenzmaterial zu finden, mit dem eine komplexe, aus mehreren Matrices bestehende Probe kalibriert werden kann. In dieser Arbeit wird beispielhaft ein Ansatz entwickelt, um Gadolinium aus MRT-Kontrastmitteln in Kresse zu quantifizieren.

Zum Ausgleich von Drifteffekten, Signalschwankungen aber auch Inhomogenitäten im Gewebe wird für die LA-ICP-MS ein interner Standard benötigt, dessen Suche sich in vielen Fällen nicht leicht gestaltet. Oft gibt es nur wenige potentielle interne Standards, de-

ren Evaluierung aber noch nicht vollständig beschrieben ist^[25]. Für die Analyse von Haaren wird beispielsweise Schwefel als interner Standard genutzt^[27]. Calcium dient dem Ausgleich von Variationen bei der Untersuchung von Zähnen^[28, 29]. Für biologische Proben wird häufig ^{13}C als homogen verteiltes Isotop verwendet^[30-33], um Variationen des Abtrags während der Laserablation – verursacht durch Ungleichmäßigkeiten der Laserenergie oder der Dicke des ablatierten Materials – auszugleichen. Durch die Verwendung von ^{13}C als internem Standard können die relativen Standardabweichungen (RSDs) verringert werden^[31], wie z. B. beim Ausgleich struktureller Unterschiede in Blättern^[32]. In einigen Veröffentlichungen wird die Verwendung von ^{13}C als internem Standard eher skeptisch betrachtet^[34]. Dies begründet sich hauptsächlich auf Studien zur Elementfraktionierung. Der Kohlenstoff verhält sich in der Partikel- und Gasphase und im Plasma meist vollkommen anders als der Analyt und ist deshalb nicht mit diesem vergleichbar^[34].

Trotz der Schwierigkeiten bezüglich der Quantifizierung wird die LA-ICP-MS immer mehr zur Methode der Wahl, um detailliert und empfindlich die Elementverteilung in biologischem Gewebe zu visualisieren^[31, 35-37]. Becker *et al.* stellten beispielsweise die Metallverteilung in Gewebeschnitten von humanem, Mäuse- und Rattenhirn^[38], aber auch die Metallverteilung von essentiellen Elementen in Blättern^[39] bildlich dar. Außerdem untersuchten sie mithilfe der Elementverteilung den Effekt auf die Nährelemente nach einer Exposition mit Kupfer^[40] mit der gleichen Methode.

Für jede Fragestellung, die mit der LA-ICP-MS bearbeitet wird, sollte ein geeigneter Standard gefunden werden. Dieser muss entweder intern oder matrixangepasst sein. Bisher ist für viele Fragestellungen die Wahl nach dem Standard offen. Diese Arbeit soll daher auch helfen, einen Standard für die Untersuchung von Gadolinium in biologischen Proben zu finden.

Zusammenfassend sind die Ziele dieser Arbeit,

- I) die Aufnahme von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln in Modellorganismen zu überprüfen,
- II) die Verteilung von Gadolinium in verschiedenen Modellorganismen mit der LA-ICP-MS bildlich darzustellen und die Ergebnisse mittels SRXRF und 3D μ -CT zu überprüfen,
- III) einen Standard zum Ausgleich von Variationen im Messsignal für die LA-ICP-MS zu finden und anzuwenden und

- IV) ein Quantifizierungskonzept für Gadolinium in Modellorganismen mittels LA-ICP-MS zu entwickeln und zu verifizieren.

Dazu werden

- a) Wasserpflanzen (Algen),
- b) Schwimmpflanzen (Wasserlinsen),
- c) Landpflanzen (Kresse) und
- d) Aquatische Kleinsttiere (Daphnien) als Modellorganismen genutzt.

Die Experimente mit Wasserlinsen (*Lemna minor*) sollen Aufschluss über die Abhängigkeit der Gd-Aufnahme von der Gd-Konzentration in der Nährlösung und der Expositionszeit geben. Mit der Kresse (*Lepidium sativum*) als Landpflanze wird die Gd-Aufnahme über die Wurzeln und die Gd-Verteilung in verschiedenen Kompartimenten (Blätter, Stängel, Wurzeln) bestimmt. Dieser Organismus wurde bereits genutzt, um die Aufnahme von Gd-Spezies mittels HILIC-ICP-MS zu untersuchen^[13]. Der Wasserfloh (*Daphnia magna*) als höherer Organismus soll genutzt werden, um die verschiedenen Aufnahmewege über die Kultivierlösung und die Nähralgen zu untersuchen. Die Exposition von Daphnien in Gd enthaltendem Kultiviermedium soll zeigen, ob Gd direkt vom Organismus aufgenommen wird. Zusätzlich sollen einzellige Algen (*Scenedesmus subspicatus*) in Gd-haltiger Nährlösung gezüchtet und zum Füttern der Daphnien (in einer sonst Gd-freien Nährlösung) verwendet werden. Dieses Experiment soll zeigen, ob Gd über die Nahrung aufgenommen werden kann. Für die Untersuchung der Aufnahme und Abgabe von Gd durch Algen werden wegen der besseren Handhabbarkeit Fadenalgen (*Zygnema*) anstelle der einzelligen Futteralgen (*Scenedesmus subspicatus*) genutzt.

Als Kontrastmittel zur Exposition der individuellen biologischen Systeme dienen Gd-DTPA (Magnevist®), Gd-DTPA-BMA (Omniscan®) und Gd-DOTA (Dotarem®).

Zur Verifizierung und/oder Ergänzung der mittels LA-ICP-MS ermittelten Gd-Verteilung werden die Röntgenfluoreszenzanalyse mit Synchrotronstrahlung (SRXRF) und die dreidimensionale μ -Computertomographie (3D μ -CT) genutzt. Die Gesamtgehalte an Gadolinium werden zusätzlich mit der ICP-MS mit Flüssigprobeneintragssystem überprüft.

II GRUNDLAGEN

1. Aktueller Kenntnisstand

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die Verwendung von gadoliniumbasierten Chelaten, deren Funktionsweise und Wirkung in der Medizin. Dabei werden auch die Gefahren, die durch die Anwendung dieser Kontrastmittel für den Menschen und die Umwelt entstehen, sowie die Stabilität einiger Chelate näher betrachtet.

1.1 Gd-basierte Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie

Gadoliniumbasierte Chelate werden seit den 1980er Jahren als Kontrastverstärker vorwiegend in der Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt. Sie können zum Teil bei hoher Proteinaffinität des Kontrastmittels auch in der Magnetresonanzangiographie (MRA) zur bildgebenden Darstellung von Blutgefäßen – z. B. zur Untersuchung der Tumordurchblutung – verwendet werden. Beide Verfahren funktionieren nach dem gleichen Prinzip.

Die MRT ist ein medizinisch diagnostisches Verfahren um Gewebe und innere Organe bildgebend darzustellen. Mit ihr lassen sich Schnittbilder des menschlichen oder tierischen Organismus erzeugen, die zur Erkennung krankhafter Gewebe- bzw. Organveränderungen genutzt werden können. Durch diese Form der Untersuchung wird die schädigende Röntgenstrahlung vermieden.

1.1.1 Grundlagen der MRT und Funktionsweise der Kontrastmittel

Die Magnetresonanztomographie ist als medizinische Anwendung der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) zu betrachten. Die NMR wird in der analytischen Chemie genutzt, um molekulare Strukturen aufzuklären. In der Magnetresonanztomographie werden mit Hilfe von Magneten ein statisches und ein hochfrequentes Feld erzeugt. Dadurch werden Atomkerne mit Eigendrehimpuls (auch Kernspin) zu einer phasensynchronen Bewegung angeregt, die ein elektrisches Signal in Form von Wechselstrom im Empfängerstromkreis induziert. Die wichtigsten Teilchen für die MRT mit Eigendrehimpuls, die im menschlichen Körper in ausreichender Zahl vorhanden sind, sind die gut beweglichen Protonen im wässrigen Medium.

Beim Anlegen eines äußeren statischen Magnetfeldes werden die Atomkerne mit Eigendrehimpuls parallel zum angelegten Magnetfeld ausgerichtet. Sie erzeugen eine longitudinale Magnetisierung. Das zusätzlich angelegte hochfrequente Wechselfeld im Radiofrequenzbereich kippt die longitudinale Magnetisierung in eine vollständige oder teilweise transversale Magnetisierung bezüglich des statischen Feldes. Die transversale Magnetisierung rotiert um die Feldrichtung des statischen Magnetfeldes – ähnlich wie ein Kreisel mit nicht senkrechter Drehachse. Die Amplitude der induzierten Spannung ist dabei proportional zur transversalen Magnetisierung.

Wird das hochfrequente Wechselfeld abgeschaltet, richten sich die Kernspins wieder parallel zum statischen Feld aus und die transversale Magnetisierung nimmt ab. Die Abklingzeit wird Relaxation genannt und ist charakteristisch für unterschiedliche chemische Verbindungen und deren molekulare Umgebung und damit für die verschiedenen Gewebearten mit unterschiedlichem Wassergehalt. Gemessen wird das Frequenzsignal, das durch die Relaxation entsteht. Die unterschiedlichen Signalstärken werden zu unterschiedlichen Helligkeiten im entstehenden Bild umgesetzt. In der Diagnostik werden jedoch nicht die Signalstärken direkt genutzt, da sie von zu vielen Parametern abhängig sind und daher Normwerte fehlen. Stattdessen werden die Kontraste der verschiedenen Gewebe beurteilt.

Die Anwendung der Kontrastmittel beruht auf den paramagnetischen Eigenschaften von Gadolinium im magnetischen Feld. Gd^{III} ist wegen seiner sieben ungepaarten Elektronen in der f-Schale besonders gut zur Kontrastverstärkung geeignet. Die ungepaarten Elektronen des Gadoliniums richten sich nach dem angelegten Magnetfeld aus und verstärken so das Magnetfeld^[41]. Das magnetische Moment der Elektronen ist dabei 680-fach größer als das der Protonen^[41]. Daher werden Protonen, die freie Koordinationsstellen im Kontrastmittelkomplex besetzen, durch die ungepaarten Elektronen des Gadoliniums beeinflusst, die die Relaxation induzieren. Diese Protonen können so schneller relaxieren, als jene, die nicht an einen Kontrastmittelkomplex koordiniert sind. Dadurch werden Signalintensitätsdifferenzen zwischen verschiedenen Geweben erhöht. Der entscheidende Unterschied in verschiedenen Geweben ist demnach die Protonendichte und damit der Wassergehalt. Folglich verändert nicht das Gd-Chelat selbst den Kontrast, sondern die Protonen in unmittelbarer Umgebung des Kontrastmittels.

1.1.2 Risiken der Anwendung Gd-basierter Kontrastmittel

Das freie Gd^{3+} -Ion ist *in vivo* hoch toxisch. Die akute letale Dosis für 50 % einer Rattenpopulation (LD_{50}) liegt bei $0.1 \text{ mmol GdCl}_3 \text{ kg}^{-1}$ ^[42]. Das entspricht einem Gd-Gehalt von 15.7 mg kg^{-1} . Auch die freien Liganden sind akut toxisch ($\text{LD}_{50}(\text{Na}_2\text{H}_3\text{DOTA, Maus})=0.18 \text{ mmol kg}^{-1}$)^[43], da sie Kationen abfangen können und somit in der Lage sind in wichtige biologische Prozesse einzugreifen.

Aufgrund ähnlicher Ionenradien ist Gadolinium ein Calciumantagonist (für Koordinationszahl 8: $\text{Gd}^{3+} r = 1.193 \text{ \AA}$; $\text{Ca}^{2+} r = 1.26 \text{ \AA}$)^[44] und blockiert Calciumkanäle^[45-47] in den Zellmembranen der Leber, Niere und des Darms. Ca^{2+} -Ionen sind für viele physiologische Prozesse von Bedeutung. Sie sind an der Synthese und Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen beteiligt, steuern Enzymaktivitäten, regulieren die Expression von Genen und bewirken die elektromechanische Kopplung bei der Muskelkontraktion^[41]. Bei $10\text{-}20 \text{ }\mu\text{g Gd kg}^{-1}$ im menschlichen Organismus können die Gd^{3+} -Ionen unlösliche Partikel bestehend aus Gd-, Ca- und Phosphationen bilden, aggregieren und in der Leber und der Milz zu einer schnellen Nekrose führen. Diese Partikel wurden in den Makrophagen der Milz, in Kupfferzellen (Makrophagen in der Leber) und Hepatozyten (Leberzellen) nachgewiesen^[48]. Außerdem beeinflusst Gd^{3+} die Kontraktilität des Myokards und das Gerinnungssystem. Daher wird es für die MRT-Untersuchungen in Form von Chelaten appliziert. Chelate sind Komplexe, die aus einem oder mehreren mehrzähligen Liganden und einem Zentralatom bestehen. Der Ligand nimmt dabei mindestens zwei Koordinationsstellen des Zentralatoms ein. Das Zentralatom ist meist ein mehrfach positiv geladenes Metallion. Die Verknüpfung von Ligand und Zentralatom erfolgt über koordinative Bindungen. Chelatkomplexe sind im Vergleich zu Komplexen mit einzähligen Liganden deutlich stabiler, je mehr Koordinationsstellen von einem Ligand besetzt werden. Dies hat zwei Ursachen: Zum einen ist bei Chelaten zur Dissoziation von Ligand und Zentralatom das Lösen aller Koordinationsbindungen gleichzeitig nötig, während die Bindungen von einzähligen Liganden – die nur eine Koordinationsstelle des Zentralatoms besetzen – mit geringerem Gesamtenergieaufwand gelöst werden kann. Zum anderen steigt die Entropie bei der Bildung von Chelatkomplexen aus Komplexen mit einzähligen Liganden, da der Chelat-Ligand mindestens zwei einzählige Liganden verdrängt. Durch die Art des Chelatliganden können die Eigenschaften der Verbindung wie z. B. die Wasserlöslichkeit beeinflusst werden.

Die Applikation der MRT-Chelatkomplexe wird intravenös oder intrathekal (zwischen die mittlere und innere Hirnhaut) bzw. bei Untersuchungen des Verdauungstraktes auch oral vorgenommen. Die verwendeten Chelate bestehen aus Polyaminocarboxylaten und können im Komplex ionisch oder neutral und offenkettig/linear oder zyklisch sein (siehe Abbildung 1). Sie sind bedeutend weniger toxisch im Vergleich zum freien Gd^{3+} -Ion. Der akute LD_{50} -Wert für $\text{Meg}[\text{Gd}(\text{DOTA})]$ (Dotarem mit Meglumin als Gegenion) liegt für Mäuse bei 11 mmol kg^{-1} [49], was einem Gd-Gehalt von 1.73 g kg^{-1} entspricht. Der Kontrastmittelkomplex ist damit etwa 100-fach weniger akut toxisch als die einzelnen Bestandteile.

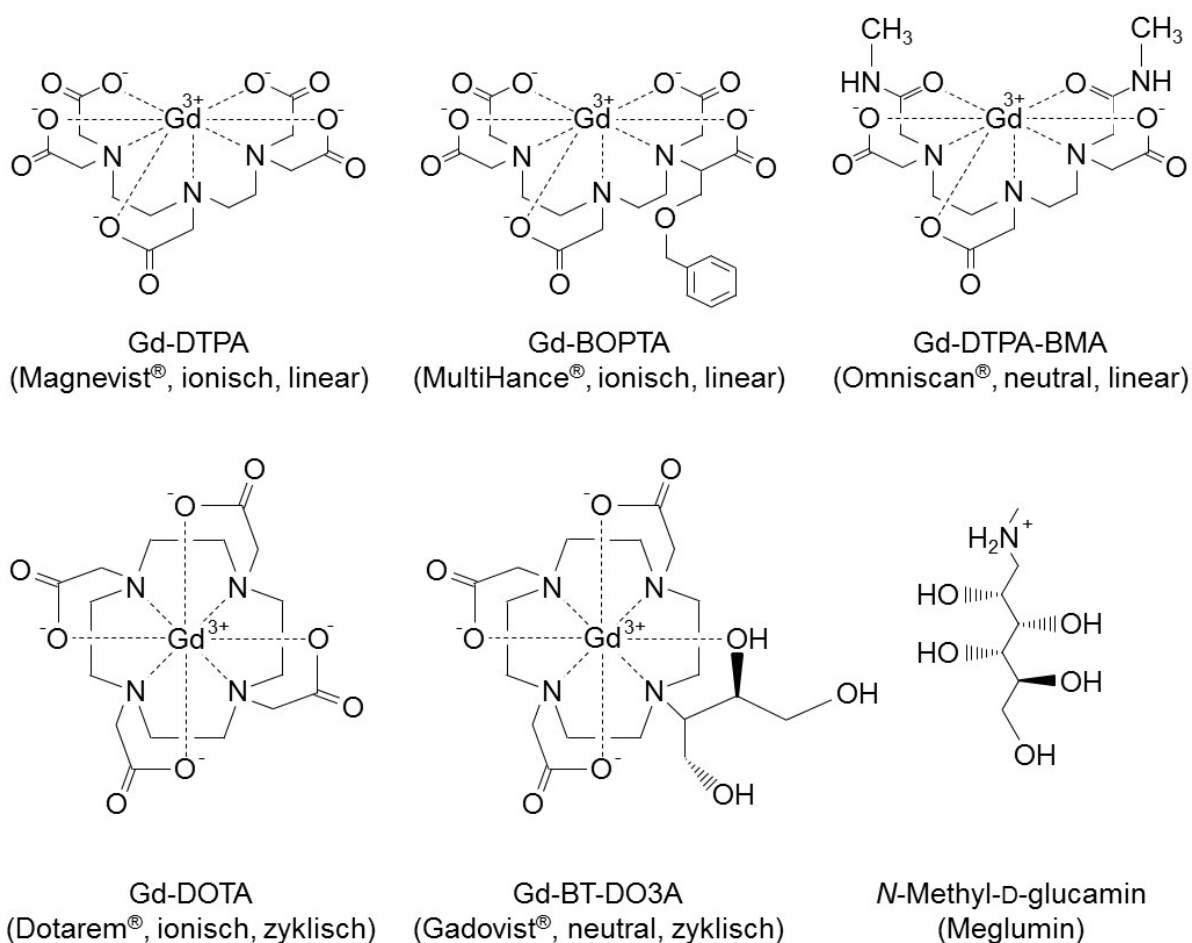


Abbildung 1: Chemische Strukturen einiger verwendeter gadoliniumbasierter Kontrastmittel^[50] und des häufigen Gegenions Meglumin

In der folgenden Tabelle 1 sind einige erprobte Gd-basierte Kontrastmittel mit ihren chemischen Namen, Gattungsnamen, Markennamen und dem Anbieter gelistet.

Tabelle 1: Klinisch relevante Gadolinium(III)-Chelate^[51]

Chemischer Name	Gattungsname	Markenname	Unternehmen
[Gd(DTPA)(H ₂ O)] ²⁻	Gadopentetat Dimeglumin	Magnevist®	Schering (Deutschland)
[Gd(DOTA)(H ₂ O)] ⁻	Gadoterat Meglumin	Dotarem®	Guerbet (Frankreich)
[Gd(DTPA-BMA)(H ₂ O)]	Gadodiamid	Omniscan®	Nycomed-Amersham (U. K.)
[Gd(HP-DO3A)(H ₂ O)]	Gadoteridol	ProHance®	Bracco (Italien)
[Gd(DO3A-Butrol)(H ₂ O)]	Gadobutrol	Gadovist®	Schering (Deutschland)
[Gd(BOPTA)(H ₂ O)] ²⁻	Gadobenat Dimeglumin	MultiHance®	Bracco (Italien)

1.1.3 Nephrogene systemische Fibrose

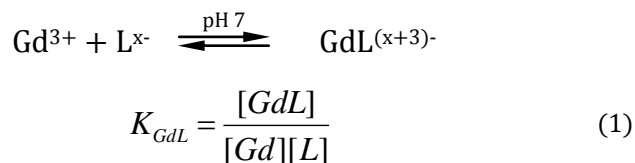
Gadoliniumhaltige Kontrastmittel galten lange Zeit als unbedenklich, bis bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion Ablagerungen von freiem Gadolinium im Weichgewebe und den Knochen gefunden wurden. Diese sind die Ursache für die nephrogene systemische Fibrose. Die Krankheit wurde im Jahr 2000 das erste Mal beschrieben, aber erst 2006 in Zusammenhang mit der Gabe gadoliniumbasierter Kontrastmittel gebracht^[9]. Die Symptome sind Schwellungen, Rötungen, Brennen und fortschreitende Verdickung und Verhärtung der Haut mit oder ohne Pigmentveränderungen, vorwiegend symmetrisch an den Extremitäten, die zur Beeinträchtigung der Beweglichkeit und Steifheit der Gelenke führen können^[9]. Die Krankheit kann progressiv und tödlich verlaufen. Die beste Behandlung besteht in einer Verbesserung der Nierenfunktion zum Beispiel durch eine Nierentransplantation. Dadurch kann die NSF verlangsamt oder sogar gestoppt und damit die Beschwerden gelindert werden^[9]. Auch die intravenöse Gabe von Natriumthiosulfat kann den Verlauf der Krankheit positiv beeinflussen, da es die Bildung von Chelaten begünstigt und damit die Löslichkeit von Gd³⁺ erhöht. Dieses kann so besser aus den Geweben transportiert werden^[52].

Die Verwendung von Komplexen die das als freies Ion toxische Gd³⁺ enthalten, birgt das Risiko, dass diese Komplexe unter physiologischen aber auch unter „natürlichen“ Bedingungen nicht dauerhaft stabil sind und so das Gd³⁺-Ion freigesetzt wird.

1.1.4 Stabilität von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln

Die Stabilität der verwendeten Komplexe ist entscheidend für deren Anwendung als Kontrastmittel. Die Komplexbildungskonstante (auch Stabilitätskonstante) leitet sich aus dem Massenwirkungsgesetz ab und ist ein Maß für die Stabilität eines Komplexes. Sie gibt

an, auf welcher Seite das Gleichgewicht zwischen freiem Ligand L^{x-} bzw. Gadoliniumion Gd^{3+} und Gd-basiertem Komplex $GdL^{(x+3)-}$ liegt (Gleichung 1).



K_{GdL} gibt die allgemeine thermodynamische Stabilität des Komplexes wieder. Basierend auf dem Massenwirkungsgesetz lassen sich nun bedingte Stabilitätskonstanten für spezielle pH-Werte bestimmen. Diese berücksichtigen die schrittweise Protonierung bzw. Deprotonierung des Komplexes (Gleichung 2).

$$K^*_{GdL} = \frac{K_{GdL}}{(1 + K_1[H^+] + K_1K_2[H^+]^2 + \dots + K_1K_2K_n[H^+]^n)} \quad (2)$$

In Tabelle 2 sind die Komplexbildungskonstanten einiger Gd-basierter Kontrastmittel bei neutralem (7.0) und physiologischem (7.4) pH-Wert gelistet.

Tabelle 2: Logarithmische Stabilitätskonstanten einiger Gd-basierter Komplexe

Ligand L	Trivialname	log K_{GdL} (pH 7.0)	log K^*_{GdL} (pH 7.4)
DTPA	Magnevist	22.46 ^[53]	17.70 ^[51]
DTPA-BMA	Omniscan	16.85 ^[54]	14.90 ^[51]
DOTA	Dotarem	25.3 ^[55]	
		24.6 ^[56]	18.33 ^[59]
		24.0 ^[57]	18.6 ^[55]
		22.1 ^[58]	
HP-DO3A	ProHance		17.21 ^[59]
		23.8 ^[55]	17.1 ^[55]
BOPTA	MultiHance	22.59 ^[53]	-

Die logarithmierten Stabilitätskonstanten log K_{GdL} der verwendeten gadoliniumbasierten Kontrastmittel im Neutralen bewegen sich zwischen 16.85 für Gd-DTPA-BMA und 25.6 für Gd-DOTA. Bei einem physiologischen pH-Wert von 7.4 sind die Stabilitätskonstanten etwas geringer.

Bianchi *et al.* geben eine ausführliche Darstellung der thermodynamischen und strukturellen Eigenschaften von gadoliniumbasierten MRT-Kontrastmitteln^[60]. Sie zeigten, dass cyclische Komplexe stabiler sind als offenkettige.

1.2 Verbleib von Gd-basierten Kontrastmitteln in der Umwelt

Bislang ist nicht vollständig geklärt, wie sich die Kontrastmittel in der Umwelt verhalten. Es ist deshalb unbedingt notwendig ihren Weg in die Umwelt und ihr Verhalten dort – auch wegen einer möglichen Anreicherung in der menschlichen Nahrungskette und einer damit dauerhaften Exposition mit Gadolinium – zu verfolgen.

Wegen der divergierenden toxischen Eigenschaften der Gd-Chelate und des freien Gd³⁺-Ions und der damit verbundenen Risiken während und nach der Medikation wurden seit 1986 die Stabilität bzw. das Dissoziationsverhalten der als Kontrastmittel eingesetzten Komplexe intensiv untersucht^[61]. Telgmann *et al.* geben in einem Review einen Überblick über den Stand der Untersuchungen^[62]. Es wurden bereits Methoden entwickelt, um die Stabilität der Gd-Komplexe *in vivo*^[63, 64] und *in vitro*^[58, 65] zu bestimmen. Für die Detektion wurden verschiedene Methoden wie die UV/VIS-Absorption, die Fluoreszenzspektroskopie, die Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) oder die ICP-MS angewendet. Die Trennung verschiedener Kontrastmittel wurde mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)^[14] bzw. hydrophiler Interaktionschromatographie (HILIC)^[3] und Kapillarelektrophorese (CE)^[66] erreicht.

Für die simultane Bestimmung von Gd-Komplexen und Gd³⁺-Ionen *in vivo* entwickelten Loreti und Bettmer eine Methode mittels Größenausschlusschromatographie-ICP-MS (SEC-ICP-MS)^[67]. Damit konnte eine quantitative Ausscheidung (> 99 %) von nicht dissoziiertem Gd-DTPA im Urin gesunder Patienten nachgewiesen werden. Eine Studie von 2008 über die Stabilität und die Dissoziationsrate von allen erhältlichen Kontrastmitteln zeigt, dass die makrozyklischen Kontrastmittel nach 15 Tagen in gespiktem Blutserum hinsichtlich der Dissoziation stabil sind^[8]. Die Dissoziationsrate von neutralen linearen Chelaten dagegen war hoch: Gd-DTPA-BMA (Omniscan) beispielsweise dissoziierte innerhalb von 15 Tagen der Inkubationszeit in Blutserum zu 20 %. Auch ein Unterschied der Stabilität neutraler und geladener linearer Komplexe in Gegenwart erhöhter Phosphatkonzentrationen konnte gezeigt werden. Da das Dissoziationsverhalten der Kontrastmittel von vielen Faktoren (pH-Wert, Phosphatkonzentration, Expositionsdauer usw.) abhängig ist und die natürlichen Bedingungen im Menschen nur schwer durch Ex-

perimente mit Blutserum angeglichen werden können, sind die Ergebnisse von *in vitro* Studien kritisch zu betrachten.

Künnemeyer *et al.* gelangten 2009 die Entwicklung einer Methode zur simultanen Bestimmung von Gd-DTPA und verschiedenen seiner potentiellen Transmetallierungsprodukte (Fe-, Cu- und Zn-DTPA) in Vollblutproben mittels CE-ESI-ToF-MS^[68]. Da Fe^{III} eine höhere Affinität zum DTPA-Komplex hat ($\log K_{\text{Fe-DTPA}} = 27.5$)^[69] als Gd^{III} ($\log K_{\text{Gd-DTPA}} = 22.46$)^[53, 70] verdrängt es das Gd^{III} aus dem linearen Chelat. Diese Transmetallierungsreaktionen sind aber vorwiegend für Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion bedeutungsvoll, da bei ihnen die Retentionszeit des Komplexes stark erhöht sein kann. Telgmann *et al.* zeigten, dass die Transmetallierungsreaktion von Gd^{III} und Fe^{III} in Blutplasma *in vitro* stark zeitabhängig ist^[11]. Der Austausch von Eisen und Gadolinium ist nicht nur während der Medikation sondern auch für den weiteren Weg des Kontrastmittels in die Abwasseraufbereitungsanlagen und die Natur von größter Bedeutung für das Verständnis über deren Verbleib und einen möglichen Metabolismus. Zwiener *et al.* entdeckten 2007, dass Fe^{III} oder Al^{III} aus Flockungsmittel in Abhängigkeit vom pH-Wert in Wasseraufbereitungsanlagen Gd^{III} aus dem Kontrastmittelkomplex verdrängen können^[12]. Bis zu 20 % des Gadoliniums können aber auch an die Flocken adsorbieren und somit aus dem Wasser entfernt werden. Auch die Bildung möglicher oxidierten Metabolisierungsprodukte konnte mittels EC(Elektrochemie)/ESI-MS simuliert werden^[10]. Dabei entstand ein *N*-dealkyliertes Polyaminocarboxylat.

Da die Kontrastmittelkomplexe wegen ihrer hohen Löslichkeit vermutlich weder an Oberflächen adsorbieren noch von partikulären organischen Substanzen absorbiert werden^[71], können diese in Klärwerken nicht bzw. nur zu einem geringen Teil über die Flockungsmittel (< 20 %)^[12] eliminiert werden.

In untersuchten Oberflächengewässern in dicht besiedelten Gebieten wurden hohe Konzentrationen an anthropogenem Gd gefunden. Der Anstieg der Gd-Konzentration in den Oberflächengewässern geht mit der zunehmenden Verwendung der Gd-Komplexe als Kontrastmittel einher. Dabei ist der Gd-Anteil im Verhältnis zu den anderen Seltenerdmetallen erhöht. Man spricht von der sogenannten positiven Gadolinium-Anomalie^[16] (Abbildung 2).

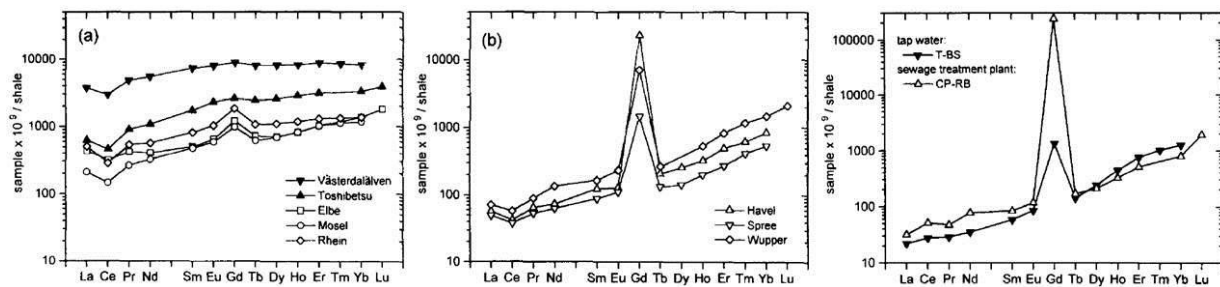


Abbildung 2: links: Gehalte der Seltenerdmetalle in flüßigem Wasser (Västerdalälven - Schweden, Toshibetsu - Japan, Elbe, Mosel, Rhein) mitte: Gehalte der Seltenerdmetalle in flüßigem Wasser (Havel, Spree, Wupper); rechts: Gehalte der Seltenerdmetalle in flüßigem Leitungswasser aus Berlin-Steglitz und in flüßigem Klärwerksabfluss aus Berlin-Ruhleben^[16]

Nur in Flüssen, die durch dünn besiedelte Gebiete fließen – wie den Västerdalälven in Schweden oder den Toshibetsu in Japan – ist noch keine positive Gd-Anomalie zu finden. In allen untersuchten deutschen Gewässern (auch Küstengebiete der Ostsee) wurden deutlich erhöhte Gd-Konzentrationen gefunden – auch im Grund-^[5] und Leitungswasser^[15]. Dadurch werden Millionen Menschen täglich mit geringen Dosen Gadolinium exponiert. Auch nah der französischen Mittelmeerküste^[72] und im Erie-See in den Vereinigten Staaten^[73] wurde bereits anthropogenes Gadolinium gefunden. Dass sich das anthropogene Gadolinium anders verhält als das natürliche, zeigten Kulaksiz *et al.* 2007^[17]. Im Meerwasser sind die Gd-Konzentrationen natürlicherweise geringer als im Süßwasser. Im Süßwasser komplexiert das Gd^{3+} im Wesentlichen an organischen Kohlenstoff z. B. in Form von Humin- oder Fulvosäuren^[74] und ist somit migrationsfähiger als im Meerwasser. Bei der Mischung von Süß- und Meerwasser kristallisiert das Gd^{3+} durch die Bindung an anorganischen Kohlenstoff (CO_3^{2-}), Phosphate, Sulfate oder Hydroxide aus^[74] und sedimentiert. Da auch Gd-Anomalien in der Ost- und Nordsee und sogar im Mittelmeer entdeckt wurden, kann daraus geschlossen werden, dass sich die Kontrastmittel in der Umwelt anders verhalten als das natürlich vorkommende Gadolinium^[17].

Das Gadolinium wurde in der Umwelt weitreichend verbreitet, weil es von Wasseraufbereitungsanlagen nicht entfernt wird. Allein in Deutschland werden jährlich etwa 1000 kg Gadolinium in die Kanalisation freigegeben, wobei im Klärschlamm kein anthropogenes Gadolinium gefunden wurde^[4, 75]. Dies zeigt, dass in der Wasseraufbereitungsanlage chemische Reaktionen oder Bakterien während der biologischen Behandlung das Gadolinium nicht effektiv entfernen^[5, 71]. Dabei wurde der Gesamtgadoliniumgehalt ohne Informationen über die Spezies bestimmt.

Die ersten speziesspezifischen Untersuchungen machten Künnemeyer *et al.* 2009^[76]. Durch die Verwendung der HILIC (hydrophile Interaktionschromatographie) in Kombination mit der ICP-MS gelang die Trennung und Identifizierung von Gd-BOPTA (MultiHance®), Gd-DOTA (Dotarem®) und Gd-BT-DO3A (Gadovist®) in Krankenhausabwasser und Klärwerksauslässen. In allen untersuchten Proben war die Gesamtgadoliniumkonzentration höher als die Summe der Konzentrationen an chelatisiertem Gadolinium. Raju *et al.* bestätigten ein Jahr später, dass neben den chelatisierten Gadoliniumverbindungen freie Gd³⁺-Ionen in den untersuchten Oberflächengewässern vorhanden sind^[3].

Lawrence *et al.* zeigten 2010, dass während eines Umkehrosmose-Schrittes bis zu 99.85 % des anthropogenen Gadoliniums in der Membran zurückgehalten werden^[77].

Um die Vermischung von Oberflächen- und Grundwasser^[78] oder die Verteilung von aufbereitetem Wasser in Oberflächengewässern^[71, 79] zu untersuchen, kann im Gewässer bereits vorhandenes anthropogenes Gadolinium als Tracer genutzt werden.

1.3 Imaging biologischer Proben

Um das Verhalten von anthropogenem Gadolinium näher zu beleuchten, kann die Wechselwirkung der Kontrastmittel mit Organismen mit bildgebenden Verfahren untersucht werden. Dafür gibt es mehrere Methoden: SIMS (Sekundärionenmassenspektrometrie), MALDI-MS (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie), ME-SALDI-MS (Matrix-verstärkte Oberflächen-assistierte Laser Desorption/Ionisation), XRF (Röntgenfluoreszenzanalyse), CT (Computertomographie), LIBS (laserinduzierte Plasmaspektroskopie), TEM (Transmissionselektronenmikroskopie), Fluoreszenzmikroskopie und LA-ICP-MS, mit denen bereits zahlreiche biologische Proben hinsichtlich ihrer Elementverteilung untersucht wurden (siehe Tabelle 3). Diese Methoden sind allerdings aufgrund sehr unterschiedlicher Eindringtiefen und Nachweisgrenzen nicht direkt miteinander vergleichbar.

Tabelle 3: Überblick über einige Untersuchungen zur Elementverteilung in biologischen Proben mit verschiedenen bildgebenden Methoden

Autor ^[Ref]	Jahr	Analyten	Biologische Probe	Methode
Arora ^[80]	2011	⁵⁵ Mn, ⁴³ Ca	Menschliche Milchzähne	LA-ICP-MS
Becker ^[81]	2010	Fe, Cu, Zn, Mn, Ti, ²³ Na, ³⁹ K, Mg, Ca, ¹³ C, ³¹ P, ³⁴ S	Mäuseherzen	LA-ICP-MS, ToF-SIMS

Autor ^[Ref]	Jahr	Analyten	Biologische Probe	Methode
Becker ^[82]	2008	²³⁵ U, ²³⁸ U, ¹⁴⁵ Nd, ¹⁴⁶ Nd	Rattenhirn	LA-ICP-MS
Becker ^[83]	2007	⁷⁸ Se, ⁸² Se, ⁶³ Cu, ⁶⁴ Zn, ¹³ C	Wegschnecke	LA-ICP-MS
Becker ^[84]	2005	⁶³ Cu, ⁶⁴ Zn, ³¹ P, ³² S, ⁵⁶ Fe, ²³² Th, ²³⁸ U	Menschliches Gehirn (Hippocampus)	LA-ICP-MS
Becker ^[85]	2005	⁶³ Cu, ⁶⁴ Zn, ³¹ P, ³² S	Tumoröses Rattenhirn	LA-ICP-MS
Boulyga ^[86]	2003	²³⁹ Pu, ²⁴⁰ Pu, ²⁴² Pu, ²⁴¹ Am, ²⁴³ Am, ²³⁸ U	Moose	LA-ICP-IDMS
Boulyga ^[87]	2004	⁵⁶ Fe, ⁵⁷ Fe, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁶⁴ Zn, ⁶⁸ Zn, ¹¹¹ Cd, ¹¹³ Cd, ²⁰⁶ Pb, ²⁰⁸ Pb	Pulverisierte Sedimente (Mündungs-, Fluss-), Weizenmehl, aquatische Pflanzen, Glas	LA-ICP-ID-MS, LA-ICP-MS
Chandra ^[88]	2003	¹⁰ B, ⁴⁰ Ca, ⁴⁴ Ca, ³⁹ K, ²³ Na, ¹⁸ F, ¹⁹ F	Einzelzellen, Gewebe	SIMS
Cizdziel ^[30]	2012	¹² C, ²⁴ Mg, ⁴⁴ Ca, ⁵⁵ Mn, ⁶³ Cu, ⁸⁸ Sr, ¹¹¹ Cd, ¹³⁷ Ba, ²⁰² Hg, ²⁰⁸ Pb	Grüne Blätter (Australische Weide, Texanisches Ebenholz, Ocotillo, Kreosotbusch, Herbst-Salbei, Brittlebush, Wandelröschen, Myoporum, Pfirsichbaumblätter, Tomatenstrauchblätter, Spinatblätter, Kiefernadeln, Zitronenbaumblätter, Tabakblätter)	LA-ICP-MS
Dobrowolska ^[89]	2008	⁶⁴ Zn, ⁶³ Cu, ²⁰⁸ Pb	Gesundes menschliches Gehirn	LA-ICP-MS
Feldmann ^[31]	2002	¹³ C, ⁶⁴ Zn, ⁶⁶ Zn, ⁶⁸ Zn, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁹⁵ Mo, ⁹⁸ Mo, ¹¹² Cd, ¹¹⁴ Cd, ¹²⁷ I, ²⁰⁶ Pb, ²⁰⁷ Pb, ²⁰⁸ Pb	Schweineleber, Schafsheber, Schafsnieren	LA-ICP-ToF-MS
Gholap ^[24]	2010	¹³ C, ³¹ P, ³⁴ S, ³⁷ Cl, ³⁹ K, ⁴³ Ca, ⁶³ Cu, ⁶⁶ Zn	<i>Daphnia magna</i> (Wasserfloh)	LA-ICP-MS, μ -XRF
Giesen ^[19]	2011	¹²⁷ I, ¹⁵³ Eu, ¹⁶⁵ Ho, ¹⁶⁹ Tm	Fibroblast-Zellen, Leber-Biopsie-Gewebe, Brustkrebsgewebe	LA-ICP-MS
Hare ^[90]	2011	⁶⁶ Zn, ⁸⁸ Sr, ¹¹¹ Cd, ²⁰⁸ Pb	Zähne	LA-ICP-MS
Hoffmann ^[91]	1994	¹² C, ²⁵ Mg, ²⁷ Al, ⁴⁴ Ca, ⁵² Cr, ⁵⁵ Mn, ⁵⁷ Fe, ⁵⁹ Co, ⁶⁰ Ni, ⁶³ Cu, ⁶⁶ Zn, ⁸⁶ Sr, ¹¹¹ Cd, ¹³⁵ Ba, ²⁰³ Tl, ²⁰⁸ Pb, ²⁰⁹ Bi, ²³⁸ U	Baumringe	LA-ICP-MS, ICP-MS

II GRUNDLAGEN - 1. Aktueller Kenntnisstand

Autor ^[Ref]	Jahr	Analyten	Biologische Probe	Methode
Hoffmann ^[32]	2000	¹³ C, ²⁵ Mg, ²⁷ Al, ⁴⁴ Ca, ⁵⁵ Mn, ⁶⁰ Ni, ⁶³ Cu, ⁸⁶ Sr, ¹³⁵ Ba, ²⁰⁸ Pb	Eichenblätter	LA-ICP-MS
Hoffmann ^[29]	2000	²⁰⁰ Hg, ²⁰¹ Hg, ²⁰² Hg, ¹⁰⁷ Ag, ¹⁰⁹ Ag, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁴⁴ Ca	Menschliche Zähne	LA-ICP-MS
Illan ^[92]	2012	-	Gehirn von Alzheimer-Patienten	CT
Jackson ^[93]	2006	¹² C, ¹³ C, ²⁴ Mg, ²⁶ Mg, ³⁹ K, ⁴³ Ca, ⁴⁴ Ca, ⁵⁶ Fe, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁶⁶ Zn, ⁶⁸ Zn	Rattenhirn	LA-ICP-MS
Jimenez ^[33]	2007	⁵⁵ Mn, ⁵⁹ Co, ⁵⁸ Ni, ⁶³ Cu, ⁶⁴ Zn, ²⁰⁸ Pb, ¹¹⁴ Cd, ²⁰² Hg, ⁵² Cr, ⁵³ Cr	Kompost	LA-ICP-MS
Kamaly ^[94]	2010	⁶⁶ Zn, ¹⁵⁷ Gd	Tumorgewebe (Maus)	LA-ICP-MS, MRT, Fluoreszenz-mikroskopie
Kang ^[28]	2004	⁴³ Ca, ⁶⁵ Cu, ⁵⁷ Fe, ²⁵ Mg, ⁸⁸ Sr, ²⁰⁸ Pb, ⁶⁶ Zn	Menschlicher Zahnschmelz, Dentinwachstumsschicht,	LA-ICP-MS
Kindness ^[95]	2003	⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁶⁴ Zn, ⁶⁶ Zn	Schweineleber	LA-ICP-MS
Liu ^[96]	2008	Tellurit-Reduktion	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Stäbchenbakterien), <i>Saccharomyces</i> (Hefepilz)	TEM
Liu ^[97]	2009	50 < m/z < 1000	Mäuseherz, Mäusehirn	ME-SALDI-MS
Matusch ^[98]	2010	Cu, Fe, Zn, Mn	Mäusehirn mit Parkinson	LA-ICP-MS
Melessanaki ^[99]	2001	-	Pigmente und Tinten von illuminierten Buchstaben eines Manuskripts	LIBS, hyperspektrale Bildanalyse,
Norris ^[100]	2012	Proteine	Rattenhirn, Mäusehirn	MALDI-MS
Polatajko ^[101]	2007	²⁶ Mg, ⁵⁶ Fe, ⁶³ Cu, ⁶⁶ Zn, ¹¹² Cd	Spinatblätter, -stängel, -wurzeln	LA-ICP-MS
Santos ^[102]	2009	⁶³ Cu, ⁶⁶ Zn, ¹¹¹ Cd, ²⁰² Hg, ²⁰⁸ Pb	Vorderkiemerschnecken	LA-ICP-MS
Sela ^[27]	2007	Zn, Fe, Cu, Cr, Pb, U	Menschliches Haar	LA-ICP-MS
Todd ^[103]	2001	Proteine	Rattenhirn, Rattenleber, Mäuseprostate	MALDI, SIMS
Wu ^[40]	2009	⁶⁵ Cu, ³⁹ K, ²⁴ Mg, ⁵⁵ Mn, ³¹ P, ³⁴ S, ¹¹ B	<i>Elsholtzia splendens</i> (Cu-toleranter Lippenblütler)	LA-ICP-MS
Wu ^[39]	2009	³⁹ K, ²⁴ Mg, ⁵⁵ Mn, ⁶³ Cu, ³¹ P, ³⁴ S, ¹¹ B	<i>Elsholtzia splendens</i> (Cu-toleranter Lippenblütler)	LA-ICP-MS
Yuan ^[104]	2012	-	Lymphknotenmetastasen	CT, MRT, PET,

II GRUNDLAGEN - 1. Aktueller Kenntnisstand

Autor ^[Ref]	Jahr	Analyten	Biologische Probe	Methode
			bei Eierstockkrebs- Patientinnen	PET/CT
Zoriy ^[105]	2007	⁶³ Cu, ⁶⁴ Zn, ¹⁹⁶ Pt	Mäuseniere	LA-ICP-MS
Zoriy ^[106]	2008	P, S, Fe, ⁶³ Cu, ⁶⁴ Zn, ¹³ C	Tumoröses Rattenhirn	LA-ICP-MS
Zoriy ^[107]	2006	⁶³ Cu, ⁶⁴ Zn, ²⁰⁸ Pb, ²³⁸ U	Tumoröses menschliches Gehirn	LA-ICP-MS

2. Methoden

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die verwendeten Methoden induktiv gekoppelte Plasmamassenspektrometrie gekoppelt mit einem Flüssigprobeneintragssystem und der Laserablation, die Röntgenfluoreszenzanalyse mit Synchrotronstrahlung und die dreidimensionale Computertomographie. Es werden die Grundprinzipien und Funktionsweisen beschrieben.

2.1 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Die induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie (ICP-MS) wurde von Houk und Gray in den 1980ern^[108] eingeführt und ist heute eine der meist genutzten Techniken für die anorganische Ultrapurenanalyse. Anwendung findet sie in der Untersuchung von Proben aus der Umwelt^[4, 22], Geologie^[20], Industrie^[109], Medizin^[110] und Bioanalytik^[91].

Ein großer Vorteil der ICP-MS ist, dass nahezu alle Elemente des Periodensystems detektiert werden können. Damit ergibt sich die Möglichkeit der Multielementanalyse. Außerdem bietet die ICP-MS einen großen dynamischen Bereich über bis zu zwölf Größenordnungen^[111] und geringe Nachweisgrenzen im unteren ng kg^{-1} -Bereich^[112].

Üblicherweise werden als Massenanalysator Quadrupol-Massenspektrometer (QMS) verwendet. Die Untersuchungen zur Bestimmung des Gadoliniumgehaltes in Aufschlusslösungen fanden an einem QMS statt. Für die Untersuchungen mit der Laserablation war wegen dessen höherer Empfindlichkeit allerdings ein Sektorfeld-Massenspektrometer (SFMS) erforderlich, da durch geringe Laserspotgrößen der Materialabtrag und die damit eingetragene Probenmenge geringer ist.

Die grundlegenden Bestandteile eines ICP-SFMS sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt und werden in den folgenden Kapiteln näher beschrieben. Dazu gehören der Probeninjektor, die Spule, die Plasmafackel, das Interface, die Ionenoptik, der magnetische Analysator, der elektrostatische Analysator, der Detektor und die Pumpen zur Erzeugung des Vakuums.

Zum Eintrag von wässrigen Proben wird eine Sprühkammer mit Zerstäuber benötigt, um ein feines Aerosol zu erzeugen, durch das die Analyten ins Plasma gelangen.

Für feste Proben ist die Laserablation ein häufig genutztes Probeneintragssystem. Während der Laserablation wird durch Wechselwirkung der Probe mit dem Laser ein Aerosol generiert, das in das Argonplasma der ICP-Plasmafackel transportiert wird. Das Aerosol wird dort atomisiert, ionisiert und über das Interface und die Ionenoptik in das

Massenspektrometer geleitet. Bevor die Ionen den Detektor erreichen, werden sie aus dem fokussierten Ionenstrahl im Massenanalysator hinsichtlich ihres Masse-/Ladungsverhältnisses aufgetrennt. Abhängig von der Art des Massenspektrometers können die Ionen simultan detektiert (Multi-Kollektor-MS) oder sequenziell gescannt (Quadrupol-MS, Single-Kollektor-MS) werden.

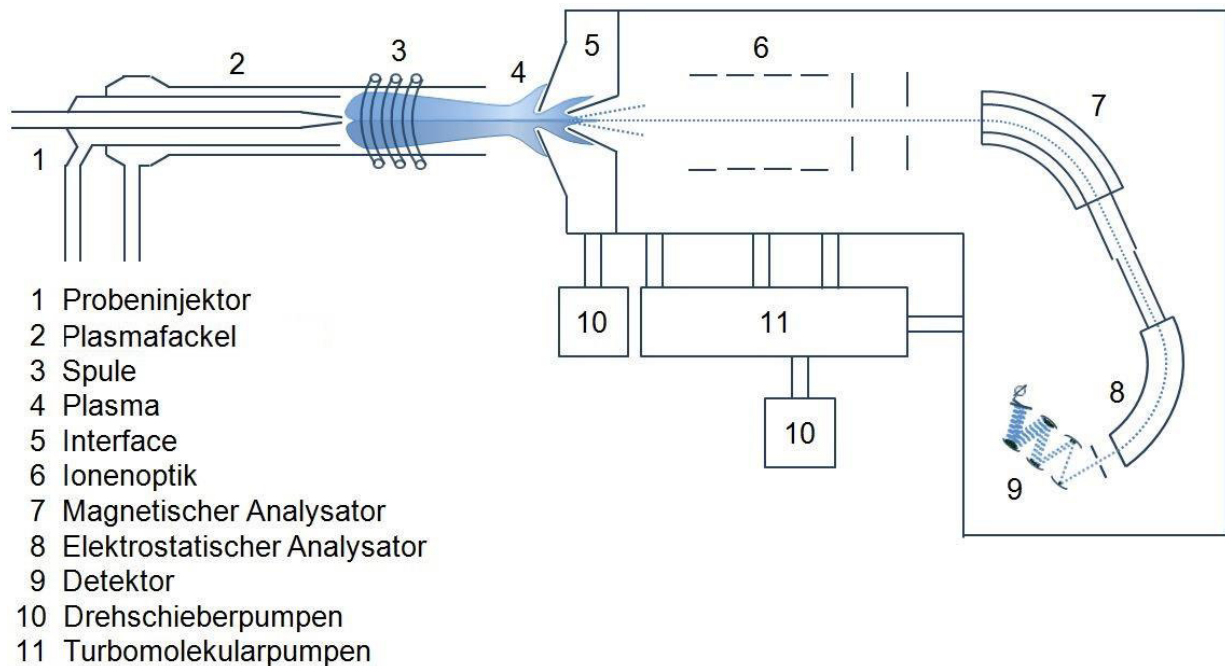


Abbildung 3: Schematische Darstellung der grundlegenden Bauteile eines ICP-SFMS

2.1.1 Induktiv gekoppeltes Plasma

Ein Plasma ist ein elektrisch leitfähiges Gemisch aus vollständig oder teilweise ionisiertem Gas (Atomen, Ionen und Elektronen). Das Plasma wird als vierter Aggregatzustand bezeichnet. Es wird gebildet, wenn ein neutrales Gas in Ionen und Elektronen gespalten wird. Dies geschieht beim induktiv gekoppelten Plasma in einer Plasmafackel, die aus drei konzentrischen Quarzrohren besteht: dem äußeren und dem mittleren Rohr und dem Probeninjektor. Das Plasmagas (auch Cool Gas genannt) wird durch das äußere Rohr mit einem Fluss von $12\text{--}17\text{ l min}^{-1}$ geleitet. Das Auxiliary Gas (Hilfsgas) fließt mit einem geringeren Fluss von etwa 1 l min^{-1} durch das mittlere Rohr. Es dient dazu die Position des Plasmas relativ zur Plasmafackel und zum Injektor zu verändern. Ein drittes Gas, das Zerstäubergas (auch Sample Gas), transportiert die Probe mit etwa $0.4\text{ -- }1.0\text{ l min}^{-1}$ in Form eines feinen Aerosols aus dem Probeneintragssystem ins Plasma.

Meist wird wegen seines hohen Ionisierungspotentials, der Verfügbarkeit in hoher Reinheit und seines geringen Preises für alle drei Gasflüsse Argon verwendet. Es können aber auch andere Gase, wie Stickstoff oder Gasgemische verwendet werden. Dadurch können störende Interferenzen wie Oxide durch Reduktion entfernt werden^[113].

Der Probeninjektor kann statt aus Quarzglas auch aus Aluminium, Platin oder Saphir bestehen, wenn dies die Analyse flusssäurehaltiger Lösungen erfordert^[114].

Die Plasmafackel ist horizontal und zentral in der Radiofrequenzspule positioniert, ca. 10 – 20 mm vom Interface entfernt. Die Spule – für gewöhnlich aus Kupfer und mit Wasser zur Kühlung durchströmt – umgibt das vordere Ende der Plasmafackel und ist mit dem Radiofrequenzgenerator verbunden. Mit diesem wird die Spule aufgeladen. Der dadurch entstehende oszillierende Wechselstrom induziert ein intensives elektromagnetisches Feld im vorderen Bereich der Plasmafackel. Ein Hochspannungsfunke erzeugt freie Elektronen und beschleunigt diese im Radiofrequenzfeld. Die Elektronen kollidieren mit Ar-Atomen und ionisieren diese. Dadurch werden immer mehr Elektronen und Ionen erzeugt. Die daraus resultierende Kettenreaktion ionisiert das Gas und ein stationäres Plasma entsteht.

Wird das Probenaerosol von der Sprühkammer über den Probeninjektor in das Plasma injiziert, werden zunächst die Tropfen desolvatisiert (Abbildung 4). Anschließend sublimieren die desolvatisierten Tropfen in den gasförmigen Zustand, werden atomisiert und schließlich durch Kollision mit den energiereichen Elektronen ionisiert. Die Ionisierungsenergie (15.759 eV^[44] von Argon) und die Energieniveaus der angeregten Zustände des Argons sind entscheidend für die Effizienz der Ionisierung der Analyten verantwortlich. Durch die hohe erste Ionisierungsenergie von Argon können fast alle Elemente angeregt und ionisiert werden.

Die Desolvatisierung, Atomisierung und Ionisierung laufen nacheinander in der Vorheizzone, der Strahlungszone und der analytischen Zone ab. Die Temperaturen dieser Zonen liegen für gewöhnlich zwischen 4000 und 7000 K, können aber auch bis zu 10000 K betragen. Das Plasma kann näherungsweise mit der Saha-Eggert-Gleichung^[115] bei Annahme eines lokalen thermischen Gleichgewichtes als eine Funktion der Temperatur und Dichte beschrieben werden.

Die Ionen werden aus der Probe über die Konen direkt in das Interface des Massenspektrometers gesaugt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das ICP die Ionenquelle des Massenspektrometers darstellt. Die Ionenerzeugung findet unter Atmosphärendruck statt. Da ein Massenspektrometer aber unter Vakuum arbeitet, ist ein Interface zur Druckanpassung erforderlich.

2.1.2 Interface

Die Aufgabe des Interface besteht darin, die Ionen effizient und kontinuierlich vom Plasma unter Atmosphärendruck zum Massenspektrometer ins Vakuum zu transportieren. Neben der Druckanpassung ist es also zur Extraktion der Ionen aus dem Plasma notwendig. Es besteht aus zwei Konen: dem Sample-Konus und dem Skimmer-Konus. Die Begriffe Sample- und Skimmer-Konus haben sich aufgrund fehlender Pendanten auch im deutschen Sprachraum eingebürgert. Beide Konen bestehen meist aus Nickel, können aber für die Analyse korrosiver Flüssigkeiten oder Gaszusätze auch aus Platin bestehen. Zwischen den beiden Konen wird ein Vorvakuum erzeugt. Nachdem die Ionen im Plasma generiert wurden, passieren sie zunächst den Sample-Konus mit einer Öffnung von 0.8 – 1.2 mm. Nach einer kurzen Distanz gelangen sie durch die 0.4 – 0.8 mm große Öffnung des spitzen Skimmer-Konus. Um die Effekte der hohen Plasmatemperatur auf die Konen zu reduzieren, wird das Interface Gehäuse mit Wasser gekühlt. Außerdem besteht es aus Materialien, die die Hitze gut abtransportieren können, wie Kupfer oder Aluminium. Vom Skimmer-Konus gelangen die Ionen in die Ionenoptik, von wo aus sie direkt in die Massenanalysatoren überführt werden.

Das Interface ist eine der kritischsten Stellen im gesamten ICP-MS-System. Die bereits im Plasma beginnende Massenfraktionierung^[116] kann sich hier fortsetzen. Im Plasma werden aus Atomen positive Ionen erzeugt, die sich gegenseitig abstoßen. Dadurch und wegen des schnellen Druckabfalls driften sie auseinander und verbreitern so den Ionenstrahl. Elektronen diffundieren stärker aus dem Ionenstrahl als die Ionen selbst, was zu einer positiven Nettoladung des Strahls führt. Damit stoßen sich die Ionen noch stärker ab. Die Ionen mit einem höheren Masse-/Ladungsverhältnis, die durch ihre Trägheit eine stabilere Flugbahn besitzen und somit das Zentrum des Ionenstrahls dominieren, gelangen so zu einem größeren Anteil durch die Öffnungen der Konen als die leichteren Ionen, die an den Rand des Ionenstrahls gedrängt werden. Leichtere Ionen sind damit nicht so empfindlich nachweisbar wie schwerere. Dies wird als „Space Charge Effekt“ (Raumladungseffekt bezeichnet^[117] und tritt über die gesamte Länge des Ionenstrahls auf. Durch

entsprechende Spannungen auf den Ionenlinsen, kann dieser Effekt verringert und der Ionenstrahl fokussiert werden.

2.1.3 Ionenoptik

Die Ionenoptik befindet sich zwischen dem Skimmer-Konus und dem Massenanalysator und dient dazu, die Analyt-Ionen mit minimalem Verlust in den Massenanalysator zu fokussieren und dabei möglichst viele Partikel, neutrale Teilchen und Photonen zu diskriminieren, wodurch der Untergrund verringert wird.

Die Ionenoptik besteht aus einer oder mehreren elektrostatisch kontrollierten Linsen. Sie sind in Serie angeordnet und leiten die Ionen durch verschiedene angelegte Spannungen vom Vorvakuum aus dem Interface in das Hochvakuum des Massenanalysators.

Für eine effiziente Funktion ist es sehr wichtig, dass die Plasmafackel, das Interface und die Ionenoptik in ihrem Design und den Einstellungen gut aufeinander abgestimmt sind.

Einige Linsensysteme besitzen eine Extraktionslinse, die elektrostatisch die Ionen vom Skimmer-Konus in die Ionenoptik ziehen. Dies hat den Vorteil, dass die Transmission und damit die Nachweisgrenzen leichter Elemente verbessert werden, was zu gleichmäßigeren Bedingungen über den gesamten Massenbereich bis zu 300 u führt. Ohne die Extraktionslinse werden – wie schon erwähnt – leichtere Elemente häufig von schwereren Elementen aus dem Ionenstrahl verdrängt. Dies würde in einer stärkeren Massenfraktionierung resultieren.

2.1.4 Massenanalysator

Das Herzstück des Massenspektrometers ist der Massenanalysator. In ihm werden die Ionen nach ihrem Masse-/Ladungsverhältnis getrennt. Nach der Trennung erfolgt die Detektion sequentiell oder simultan (Multikollektor) indem die individuellen Ionenströme gemessen werden. Durch das detektierte Masse-/Ladungsverhältnis (m/z -Verhältnis) können die Analyten (Isotope bzw. Moleküle) meist zweifelsfrei identifiziert werden. Die Intensität m/z pro s steht in direktem Zusammenhang mit der Quantität der Atome des Analyten in der Probe, wobei eine stöchiometrische bzw. homogene Verteilung des Analyten in der Probe vorausgesetzt wird. Dabei ist die Abtrennung der Analyten von den

anderen Probenbestandteilen, wie matrix-, lösemittel- oder argonbasierten Ionen wichtig, da diese als spektrale Interferenzen das Analytsignal stören würden.

Je nach Art des Massenspektrometers erfolgt die Separation der Ionen unterschiedlich. Das am häufigsten verwendete Massenspektrometer ist ein Quadrupol-Analysator. Dieses ist besonders schnell und wenig kostenintensiv. Es besteht aus vier zylindrischen Stäben, die parallel zueinander angeordnet sind. Die Mittelpunkte der Querschnitte bilden ein Quadrat. An den gegenüberliegenden Stäben sind komplementäre Gleichspannungen angelegt, die mit einer Wechselspannung überlagert sind. Die Kombination aus Wechsel- und Gleichspannung erlaubt nur denjenigen Ionen mit einem bestimmten Masse-/Ladungsverhältnis auf einer Spiralbahn zwischen den Stäben stabil in Richtung Detektor zu fliegen. Alle anderen Ionen kollidieren mit den Stäben. Die Scangeschwindigkeit mit einem Quadrupol-Massenspektrometer ist schneller als beispielsweise mit einem Sektorfeld-Massenspektrometer (kompletter Massenbereich in $0.1 \text{ s}^{[118]}$), weil das elektrische Feld nicht nur sehr schnell alternieren, sondern hysteresefrei verändert werden kann.

Das Sektorfeld-MS bietet im Vergleich zum Quadrupol-MS eine bessere Empfindlichkeit bei gleicher oder leicht höherer Massenauflösung. Bei einer höheren Auflösung reduziert sich die Empfindlichkeit allerdings.

Doppelfokussierende Sektorfeld-Massenspektrometer (SFMS) enthalten einen magnetischen und einen elektrostatischen Analysator. Die häufigste Geometrie ist die reverse-Nier-Johnson-Geometrie, die die Anordnung der Analysatoren festlegt.

Der magnetische Sektor (MSA) des Massenanalysators besteht aus einem Elektromagneten, der die Ionen mit gleicher spezifischer Ladung auf eine Kreisbahn mit dem Radius r lenkt. Durch eine Beschleunigungsspannung wird auf alle Ionen die gleiche kinetische Energie übertragen. Je leichter das Ion ist, desto größer ist seine Ablenkung auf der Kreisbahn. Der MSA trennt die Ionen also hinsichtlich ihrer Masse und ihres Impulses. Zusätzlich zum Magneten besteht das doppelfokussierende SFMS aus einem dahinter geschalteten elektrostatischen Analysator (ESA). Der ESA erzeugt ein elektrisches Feld und trennt hinsichtlich der kinetischen Energie der Ionen.

Für die Messung von Isotopen wird die magnetische Feldstärke so eingestellt, dass ein Massenbereich damit abgedeckt ist. Innerhalb eines kleineren Massenbereiches wird die Beschleunigungsspannung verändert, so dass konkrete Massen in diesem Massenbereich angesteuert werden können. Der spektrale Peak wird durch das elektrische Feld gescannt

(E-Scan). Anschließend wird vom elektrischen Feld die nächste Masse angesteuert, so dass der nächste E-Scan durchgeführt werden kann. Wenn die interessierenden Massen in diesen Massenbereich gemessen wurden, fährt der Magnet den nächsten Massenbereich an und das Verfahren wiederholt sich. Wird die Beschleunigungsspannung bei Veränderung der magnetischen Feldstärke konstant gehalten, wird ein B-Scan durchgeführt. Durch das auch in dieser Arbeit verwendete doppelfokussierende SFMS kann die Auflösung im Vergleich zu einem einfachfokussierenden Sektorfeldgerät gesteigert werden, da die Ionen im doppelfokussierenden SFMS sowohl im MSA als auch im ESA fokussiert werden, während die Ionen im einfachfokussierenden SFMS lediglich im MSA fokussiert werden.

Die Auflösung R ist dimensionslos und definiert als Quotient aus der Massenzahl m und der Massendifferenz Δm :

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (3)$$

Δm ist dabei die Massendifferenz, die notwendig ist, um ein Tal von 10 % zwischen zwei benachbarten Signalen zu erhalten. Mit dem doppelfokussierenden SFMS können durch Variation der Spaltzunge – also der Blende – Auflösungen von etwa 300, 4000 und 10 000 eingestellt werden. In dieser Arbeit war für die Messungen von $^{158}\text{Gd}^+$ in biologischen Proben die geringe Auflösungseinstellung (300) des Sektorfeldgerätes ausreichend, weil dabei keine nennenswerten Interferenzen auftreten. Die Messung zur Ermittlung der Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenzen (BG) erfolgte allerdings in mittlerer Auflösung (~ 4000), da es notwendig war Interferenzen von einigen anderen Isotopen abzutrennen. Für die Trennung von $^{56}\text{Fe}^+$ und $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ wird beispielsweise eine Auflösung von mindestens $R = 2503$ benötigt.

2.1.5 Detektor

Die Ionen werden mit einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) detektiert. Dieser wird zum Nachweis positiv geladener Ionen verwendet. Er besteht aus mehreren nacheinander geschalteten Dynoden, bei denen innerhalb der Anordnung die Spannung steigt. Die Anordnung der Dynoden kann dabei diskret (nahezu parallel) oder kontinuierlich (trinkhornförmig) sein. Das eintreffende positiv geladene Ion schlägt aus der Konversionsdynode ein Elektron heraus, das auf den weiteren Dynoden eine Elektronenlawine auslöst. Dadurch wird ein detektierbarer Strom erzeugt, der proportional zur Anzahl der

auftreffenden Teilchen ist. Es werden counts per second (cps, Ereignisse pro Sekunde) gemessen. Für niedrige Intensitäten wird die Kaskade bis zur letzten Stufe des Detektors durchlaufen (Counting Mode). Bei höheren Intensitäten wird die Kaskade nach einigen Dynoden abgebrochen (Analog Mode). So wird der Detektor vor zu starken Belastungen geschützt. In dieser Arbeit wurde in beiden Modi gemessen.

2.1.6 Probeneintrag

Es gibt unterschiedliche Verfahren für den Probeneintrag in das ICP-MS. Dabei spielt der Aggregatzustand der Probe eine entscheidende Rolle. Zunächst werden Methoden für den Eintrag flüssiger Proben und aufgeschlossener fester Proben und im Anschluss für den Eintrag fester Proben ohne Aufschluss vorgestellt.

2.1.6.1 Flüssigprobeneintrag

Hauptanwendungen der ICP-MS sind Analysen von aufgeschlossenen Feststoffen und flüssigen Proben. Der Eintrag einer flüssigen Probe besteht im wesentlichen aus zwei separaten Schritten: der Aerosolbildung mittels Zerstäuber und der Tropfenselektion durch die Sprühkammer.

Zunächst wird die Probe dem Zerstäuber zugeführt. Dies kann entweder mit einer peristaltischen Pumpe oder – wie in dieser Arbeit – selbstansaugend realisiert werden. Im selbstansaugenden System ist der Venturi-Effekt die treibende Kraft. Dieser bewirkt, dass eine durch ein Rohr (Zerstäuber) fließende Flüssigkeit an einer enger werdenden Stelle des Rohres die höchste Geschwindigkeit erreicht. An der engsten Stelle entsteht durch das schnell zuströmende Argon (Sample Gas) in der Düse ein Unterdruck, der die Flüssigkeit ansaugt. An der Spitze des Injektors bilden sich so Verwirbelungen. Mit dem Argon werden Tropfen mitgerissen, wodurch ein feines Aerosol generiert wird.

Da das Plasma große Tropfen nicht effizient desolvatisieren kann, sind Sprühkammern so konstruiert, dass sie einen kontinuierlichen Fluss feiner Tröpfchen mit einem Durchmesser von 1-10 μm generieren. Größere Tropfen werden verworfen.

Die häufigsten in der ICP-MS und auch in dieser Arbeit verwendeten Zerstäuber haben ein konzentrisches Design (Abbildung 4). Sie bestehen aus zwei konzentrischen Rohren durch deren innere Kapillare die Lösung fließt. Durch den schnellen Argonfluss in der

äußeren Kapillare wird die Probe vernebelt. Diese Zerstäuber bieten eine gute Empfindlichkeit und Stabilität für Lösungen mit einem Matrixanteil von bis zu 0.2 %.

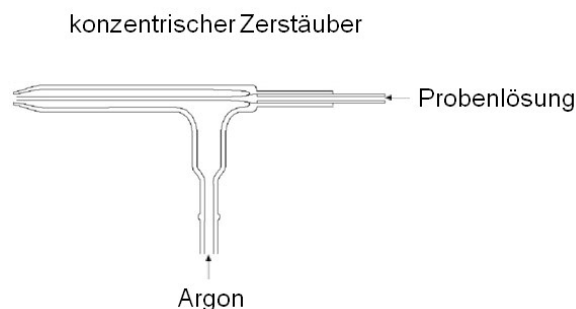


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines konzentrischen Zerstäubers

Auch ein Crossflow-Design ist möglich. Dabei treffen Gas und Probe im 90° Winkel aufeinander, wodurch dieses Probeneintragssystem toleranter gegenüber ungelösten Partikeln ist.

Nach dem Zerstäuber gelangt das Aerosol in die Sprühkammer. Die am meisten gebräuchlichsten Sprühkammern sind die Scott-Sprühkammer und die Zyklon-Sprühkammer. Auch in dieser Arbeit wurden für die Untersuchungen der Aufschlusslösungen beide Sprühkammern verwendet. Die Hauptaufgaben der Sprühkammer bestehen in der Tropfenselektion und der Glättung der Pulse durch die peristaltische Pumpe bei nicht selbstansaugenden Systemen. Da in dieser Arbeit ein selbstansaugendes System verwendet wurde, war die Glättung der Pulse nicht nötig. Durch eine externe Kühlung kann die Probe thermisch stabilisiert, der Wasseranteil reduziert und somit die Oxidbildung verringert werden^[112].

Die Scott-Sprühkammer (Abbildung 5) diskriminiert die Tropfen durch deren unterschiedliche Trägheit im Gasstrom. Während die kleinen Tröpfchen durch ein zentrales Rohr und anschließend im 180° Winkel in das äußere Rohr zum ICP-MS geleitet werden, kollidieren die größeren Tropfen ($> 10 \mu\text{m}$) mit der Wand und verlassen die Sprühkammer über einen Abfluss.

Die Zyklon-Sprühkammer trennt die großen von den kleinen Tropfen durch die Zentrifugalkraft. Ein tangential angelegter Argon-Fluss leitet die kleinen Tropfen direkt zum ICP-MS, während die größeren Tropfen gegen die Wand prallen und abgeleitet werden.

Bei maximaler Effizienz gelangen bei Flüssigprobeneintragssystemen trotzdem nur 1-5 % der Probe ins Plasma^[112].

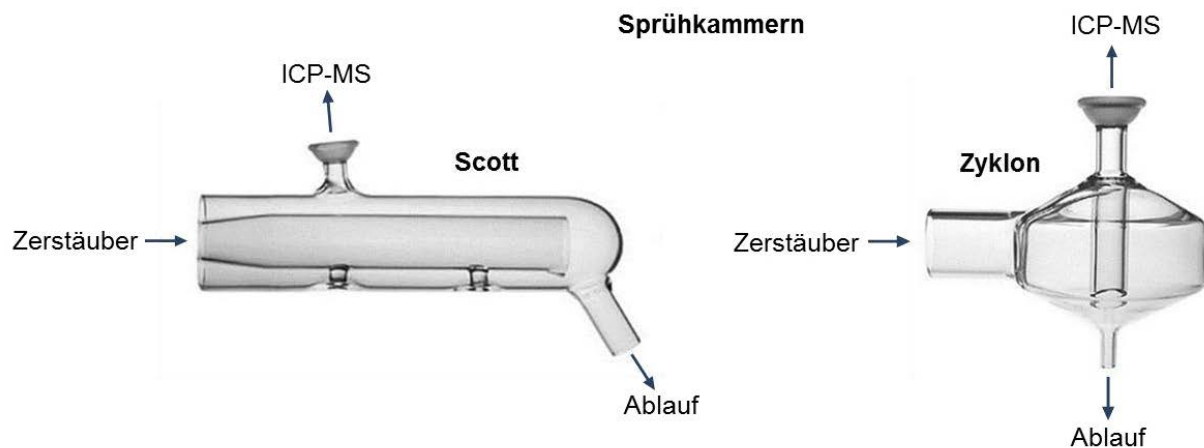


Abbildung 5: Photos der Scott-^[119] und der Zyklon^[120]-Sprühkammer

2.1.6.2 Laserablation

Die Kopplung der Laserablation mit der ICP-MS ist eine direkte Feststoffmethode, mit der orts aufgelöst Elemente im Spurenbereich gemessen werden können. Auch die Bestimmung von Isotopenverhältnissen ist möglich^[121]. Neben Feststoffen können auch Fluide untersucht werden^[122].

Die erste Publikation aus dem Jahr 1985 geht auf Gray^[123] zurück. Heute werden nicht nur Bulk-Materialien (z. B. Qualitätskontrolle von Halbleitern^[124]), geologische und biologische Proben untersucht, sondern auch Analysen in der Kriminalistik^[27] durchgeführt.

Ein Laser erzeugt kohärente Photonen, die in ihrer Phase, Polarisation, Richtung und Frequenz identisch sind. Die Festkörper-Nd:YAG-Laser (Yttrium-Aluminium-Granat $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{15}$ mit $\approx 1\%$ dotierten Nd^{3+} -Ionen) sind neben den ArF-Excimer-Lasern die am häufigsten verwendeten Lasersysteme zur Untersuchung der Elementverteilung in biologischen Matrices. Der Laserstab bildet zusammen mit den Spiegeln einen Resonator. Der grundlegende Aufbau ist in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

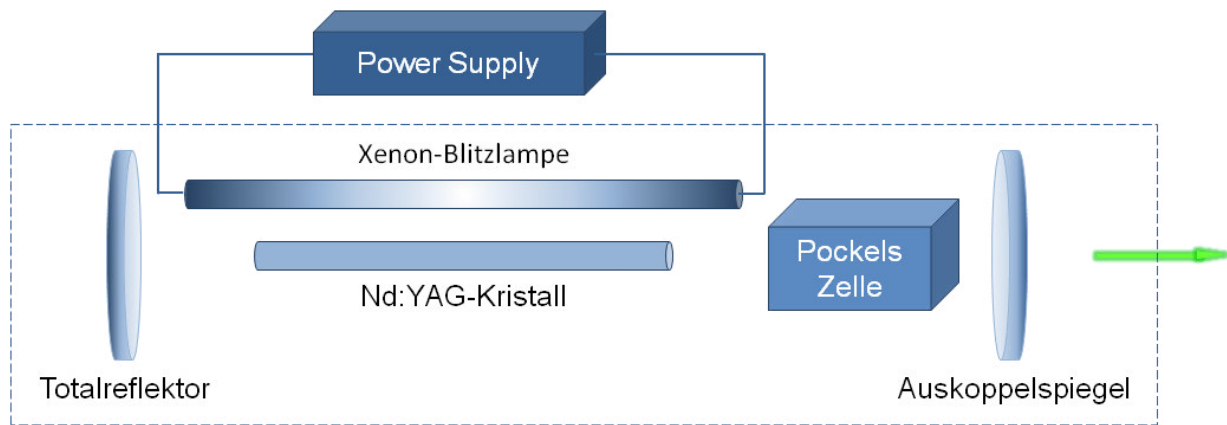


Abbildung 6: Grundlegender Aufbau eines Nd:YAG-Lasers

Mit Hilfe einer Xenon-Blitzlampe werden einige Elektronen des dotierten Neodyms vom Grundzustand E_0 in den angeregten Zustand E_3 angehoben (optisches Pumpen genannt), von dem sie spontan in den metastabilen Zustand E_2 übergehen (Abbildung 7). Wenn der Anteil an angeregten Atomen größer ist, als der Anteil der Atome, die sich im Grundzustand befinden, ist der Zustand der Besetzungsinversion erreicht. Es genügt nun ein emittiertes Photon mit der gleichen Energie, wie die der angeregten Elektronen, um einen Lawineneffekt auszulösen. Die dabei von den angeregten Atomen emittierten Photonen haben die gleichen Wellenlänge, Frequenz und Phase, wie das stimulierende Photon. Dieser Prozess wird stimulierte Emission genannt.

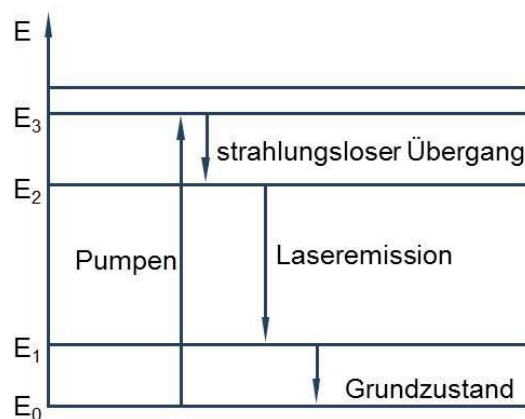


Abbildung 7: Elektronenübergänge im Neodym des Nd:YAG-Lasers während des Laserprozesses

Die Photonen, die sich parallel zum Laserstab bewegen, werden verstärkt und diejenigen, die nicht parallel sind, werden durch Interferenz ausgelöscht. Zusätzlich zu der Verdopplung des stimulierenden Photons, verstärkt das Design des Resonators zusätzlich das Licht. In diesem hat ein Photon bei mehrmaligem Durchlaufen des Lasermediums mehrfach die Gelegenheit andere Atome zu stimulieren. Der dadurch entstehende kohärente

Laserstrahl hat eine Pulsdauer von $\approx 100 \mu\text{s}$. Diese kann durch eine Pockels-Zelle^[125] auf einige Nanosekunden reduziert werden, indem die stimulierte Emission verzögert und dadurch ein großer Anteil angeregter Atome erzeugt wird, die durch Öffnen des Verschlusses in einem kurzen und energiereichen Puls entladen werden.

Üblicherweise wird für die Laserablation UV-Licht mit möglichst kurzen Wellenlängen verwendet, da diese besser mit der Probe einkoppeln, eine geringere Elementfraktionierung hervorrufen und zudem kleinere Partikel mit einer geringeren Größenverteilung erzeugen^[126].

Nd:YAG-Laser emittieren infrarotes Licht mit einer Wellenlänge von 1064 nm. Durch Frequenzvervielfachung können verschiedene andere Wellenlängen erzeugt werden. In dieser Arbeit wurde ein Laser mit einer Wellenlänge von 213 nm (quintuplet, 5-fach) verwendet.

Die Pulsdauer sollte so kurz wie möglich sein, um Fraktionierungseffekte zu verringern^[127-129] und ein Schmelzen der Probe zu verhindern^[130]. Für die gezeigten analytischen Untersuchungen wurde im ns-Bereich^[131] gemessen. Mit Blenden und Linsensystemen wird der Laserstrahldurchmesser von einigen Millimetern auf Mikrometer fokussiert.

Während der Ablation laufen mehrere Prozesse ab. Zunächst wird durch den Energieeintrag während des Laserpulses die Oberfläche des Materials stark erhitzt, wodurch das Material verdampft wird. Die weitere Erwärmung des ausgeworfenen Materials durch den andauernden Laserpuls führt zur Bildung eines Plasmas auf der Probenoberfläche. Neben den primären werden auch sekundäre Aerosolpartikel durch die Kondensation des verdampften Materials gebildet. Während sich größere Partikel neben dem Krater ablagern, werden kleinere Partikel und freie Moleküle vom Transportgas zum ICP-MS befördert und – wie in Kapitel II beschrieben – atomisiert, ionisiert, nach ihrem Masse-/Ladungsverhältnis getrennt und schließlich detektiert.

Helium eignet sich als Ablationsgas besser als Argon, da Helium wegen seiner höheren thermischen Leitfähigkeit die Energie des Plasmas schneller abtransportieren kann. Dies hat zur Folge, dass in einer Heliumatmosphäre die Bildung größerer Partikel durch Koaleszenz verringert wird^[108]. Damit sinkt der Verlust an Probe während des Ablations- und Transportprozesses. Die kleineren Partikel können effizienter transportiert werden, wodurch sich eine höhere Empfindlichkeit^[132] ergibt. Untersucht wurde dieser Effekt an Messingreferenzmaterial^[133].

Ein Problem bei der Laserablation ist die Elementfraktionierung. Eine Elementfraktionierung tritt dann auf, wenn sich die stöchiometrische Zusammensetzung der Probe bzw. der Partikel während der Ablation, des Transportprozesses, der Verdampfung, der Atomisierung oder der Ionisierung verändert^[126, 127]. Die für die Laserablation verwendeten Parameter (Wellenlänge des Lasers, Bestrahlungsstärke, Fokusposition, Pulsdauer, Wiederholrate, Tiefe der Ablation, Strahldurchmesser und Probenmatrix) beeinflussen die Zusammensetzung des Aerosols und damit den Grad der Elementfraktionierung. Auch wenn schon viele Untersuchungen durchgeführt wurden, um den Effekt zu minimieren bzw. zu eliminieren, ist die komplexe Korrelation aller Faktoren noch nicht ganz erklärt^[134]. Die Mechanismen sind mit Verdampfungs- und Kondensationsprozessen verknüpft, da die Fraktionierungsindizes (Fraktionierung relativ zu einem Bezugselement) der einzelnen Elemente mit ihren Kondensationstemperaturen korrelieren. Die Elemente lassen sich durch ihre Fraktionsindizes in die Goldschmidt-Klassifikation gruppieren: lithophil \triangleq silikatliebend, siderophil \triangleq eisenliebend und chalkophil \triangleq schwefelliebend.

Studien von Kuhn *et al.*^[135] und Guillong *et al.*^[136, 137] zeigen, dass die Partikelgröße einen entscheidenden Einfluss auf Fraktionierungseffekte hat. Bei Untersuchungen an Messing lässt sich dieser Effekt gut beobachten. Größere Partikel (> 100 nm) sind mit Kupfer angereichert, während kleinere Partikel eher Zink enthalten. Außerdem ist zu beobachten, dass auch der Grad der Fraktionierung mit der Größe der Partikel zunimmt^[137]. Da größere Partikel im Plasma meist nicht vollständig verdampfen und deshalb teilweise nicht ionisiert werden können, müsste das Cu-Zn-Verhältnis abnehmen. Da Zink aber einen geringeren Schmelzpunkt als Kupfer hat, ist das aus den LA-ICP-MS-Messungen resultierende Cu-Zn-Verhältnis höher als das für zertifizierte Referenzmaterialien angegebene. Es ist also schwierig, verschiedene Ursachen für Fraktionierungen separat zu untersuchen. Sie können sich sowohl kompensieren als auch verstärken^[135].

Fraktionierungseffekte und auch Matrixeffekte lassen sich meist durch geeignete Messbedingungen und matrixangepasste Kalibrierungen minimieren. Derzeit stehen allerdings – vor allem für biologische Proben – nur sehr wenige matrixangepasste Standards und Referenzmaterialien zur Verfügung^[129].

Auch die Ablationszelle hat einen Einfluss auf die Empfindlichkeit und die Präzision der Messung. Die Zellen sind so konstruiert, dass der Aerosolverlust minimal^[133], die Aerosoldichte maximal, die Auswaschzeiten kurz und die Signaldispersion gering ist. Die Signalintensität sollte möglichst unabhängig von der Position der Probe in der Zelle sein.

Die Vorteile der LA-ICP-MS sind die hohe laterale Auflösung im unteren μm -Bereich, die Möglichkeit zur Multielementanalyse und die geringen Nachweisgrenzen im unteren $\mu\text{g kg}^{-1}$ -Bereich. Durch die direkte Analyse ist die Probenvorbereitung meist einfach und schnell. Die geringen Laserspotgrößen erlauben Analysen sehr geringer Probenmengen.

Nachteilig wirken sich der hohe Verbrauch an Gasen ($\leq 1 \text{ l min}^{-1}$ Helium + ca. 15.5 l min^{-1} Ar), Matrixeffekte, Elementfraktionierungseffekte und Interferenzen aus. Außerdem wird die Probe lokal zerstört und steht damit nicht weiteren Analysen zur Verfügung.

Ein Schema der verwendeten Laserablationszelle ist in Abbildung 8 dargestellt. Diese besteht aus einem etwa $10 \times 10 \text{ cm}$ großen beweglichen Probenstisch und einem kleineren zylinderförmigen, statischen Cup (Becher). Durch dieses sogenannte Doppelzellendesign ist es möglich große Proben (maximal $10 \times 10 \text{ cm}^2$) in einem kleinen Ablationszellenvolumen zu untersuchen. Dadurch kann die Probe orts aufgelöst vollständig ablatiert werden. Das Ablationsfenster schließt das System nach oben, ist aber für den Laserstrahl durchlässig. Der Ort der Ablation verändert sich zwar bezüglich des Probenstisches, aber nicht bezüglich zum Cup, wodurch die Auswaschzeiten an jedem Punkt während der gesamten Messung stabil bleiben.

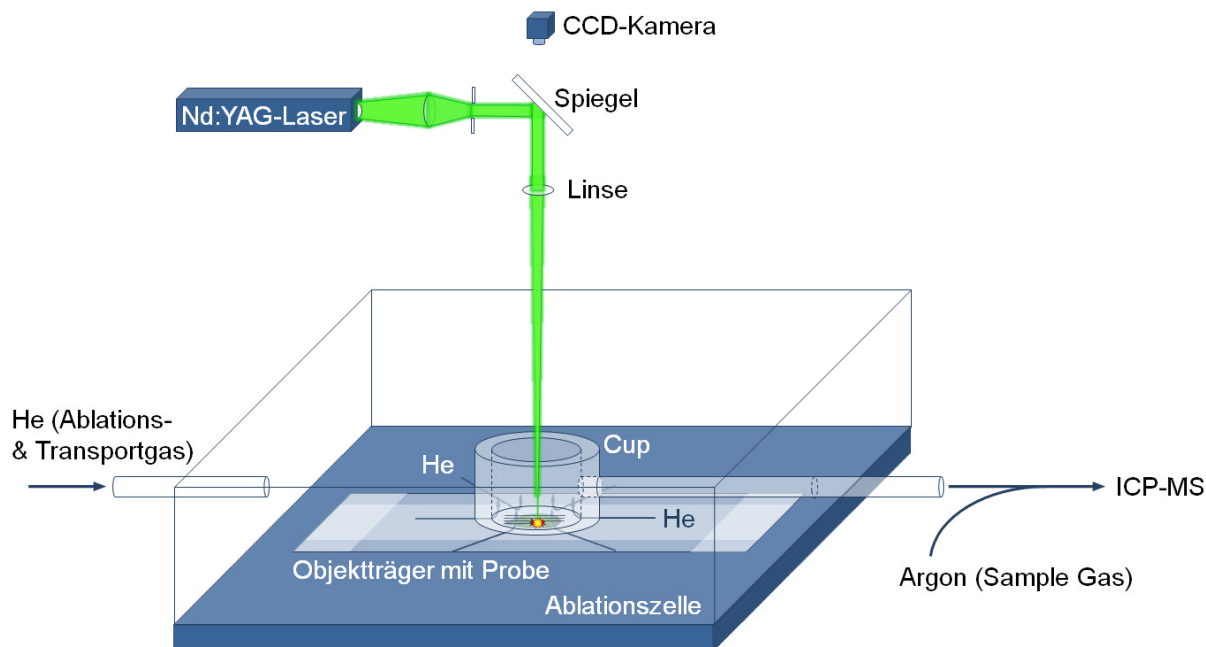


Abbildung 8: Schema der Laserablation mit dem NRW-213, New Wave

In dieser Arbeit wurde der Linienscanmodus genutzt, um die Probe zu ablatieren. Dabei wird die Probe in nebeneinanderliegenden Linien mit dem Laser vollständig ablatiert. Es können folgende Parameter variiert werden: die Fokussierung des Laserstrahls, dessen

Pulsenergie und damit die Bestrahlungsstärke, die Laserspotgröße, die Scangeschwindigkeit, die Wiederholrate der Laserpulse und der Abstand zwischen den Linien. Mit Hilfe einer Kamera wurde vor der Messung durch eine Linse auf die Oberfläche der Probe fokussiert. Durch die Bestrahlungsstärke kann der Energieeintrag pro Flächeneinheit reguliert werden. Die Laserspotgröße beschreibt den Durchmesser des runden Laserstrahls im Fokus. Dabei ist die tatsächlich ablatierte Fläche auch von der Probe abhängig. Durch Variation der Scangeschwindigkeit kann die Geschwindigkeit der Bewegung des Probenstückes und damit der horizontalen Ablation festgelegt werden. Die Wiederholrate beschreibt die Anzahl der Laserschüsse pro Sekunde auf die Probe. Durch die Optimierung des Abstands der nebeneinander liegenden Linien können Variationen in der Laserspotgröße auf den verschiedenen Matrices ausgeglichen werden. In dieser Arbeit wurde ein Linienabstand von der Spotgröße abzüglich 10 % gewählt, um die Linien nebeneinander – ohne Lücke zwischen den Linien – ablatieren zu können und damit einen auf die Fläche bezogen vollständigen Abtrag zu gewährleisten.

Vor dem Beginn der Messung wurden an einer jeweils separaten Probe die Bestrahlungsstärke, die Scangeschwindigkeit und der Abstand zwischen den Linien optimiert, so dass einerseits die Ablation vollständig war und andererseits das Entstehen großer Partikel minimiert wurde.

Bedingt durch die Wiederholrate des Lasers und die Scangeschwindigkeit wird die Probe in mondsichelförmigen Teilen ablatiert (siehe Abbildung 9). Dies gilt nur, wenn die Probe so dünn ist, dass die gesamte Schicht mit einem Laserschuss ablatiert wird.

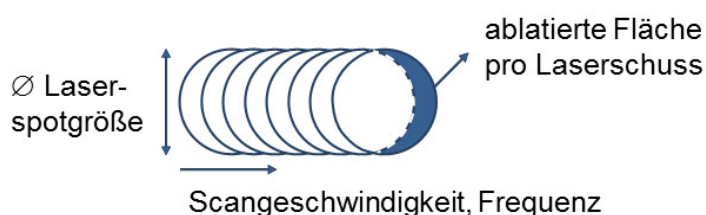


Abbildung 9: Schema der Ablation eines Linienscans, wobei der farbige mondsichelförmige Bereich einem ablatierten Segment entspricht (frei nach ^[138])

In der Ablationszelle herrscht ein Überdruck von etwa 1.7 bar. Durch einen Volumenstromregler wird der Heliumgasstrom reguliert, der das gebildete Aerosol zum ICP-MS transportiert. Hinter der Ablationszelle und vor dem ICP-MS wird dem Aerosol Argon zugegeben, um das Plasma nicht zu destabilisieren. Außerdem besteht die Möglichkeit die Eindringtiefe des Aerosols in das Plasma über die Fließgeschwindigkeit des zugefügten

Argons zu regulieren. Aus den gemessenen Daten kann so eine zweidimensionale Intensitätsverteilung der Analyten erstellt werden.

2.1.6.2.1 Interner Standard

Die quantitative Untersuchung biologischer Proben hinsichtlich ihres Elementgehaltes mittels LA-ICP-MS ist eine besondere Herausforderung, da bisher nur wenige Referenzmaterialien und Kalibrierstandards vorhanden sind und biologische Proben aus vielen unterschiedlichen Geweben bestehen, die jede für sich als eigene Matrix behandelt werden müssten. Die verschiedenen bisher entwickelten Quantifizierungsstrategien für das Elementimaging von biologischen Proben mittels LA-ICP-MS sind im Review von Hare *et al.*^[25] ausführlich beschrieben.

Der erste wichtige Schritt ist, einen internen Standard zu finden, um die Messung mit dem ablatierten Material korrelieren zu können.

Ein interner Standard erlaubt im Idealfall vier Korrekturen:

1. Ausgleich von Gerätedriften, z. B. LA oder MS
2. Ausgleich von kurzfristigen Signalschwankungen verursacht durch Geräte, z. B. LA oder ICP
3. Ausgleich von Änderungen der Matrixeigenschaften, z. B. Gewebedichte, -dicke, -zusammensetzung
4. Probenverluste, z. B. durch Probenvorbereitung

Die Voraussetzungen, die der interne Standard dabei erfüllen sollte, sind^[139]:

1. Homogenität innerhalb der Probenmatrix
2. Ähnliches Ablationsverhalten wie der Analyt
3. Ähnliche Transporteigenschaften wie der Analyt
4. Ähnliche Ionisationseigenschaften wie der Analyt
5. Interferenzfreiheit

Die Anzahl von Elementen, die sich als interne Standards für biologische Matrices eignen, ist begrenzt. Am häufigsten wird ^{13}C zur Standardisierung verwendet^[31, 32]. Die Veränderung des ^{13}C -Signals geht zum Beispiel bei der Untersuchung von Eichenblättern mit Strukturveränderungen in der biologischen Matrix einher^[32].

Giesen *et al.* verwendeten Iod, um Gewebeinhomogenitäten in Dünnschnitten von humanem Gewebe auszugleichen. Die Untersuchungen wurden an Mammakarzinomgewebeschnitten mit einer Laserspotgröße von 200 μm durchgeführt. Dass Iod an Proteine

in der Zelle bindet, wurde durch die Untersuchung von iodierten Einzelzellen (Fibroblasten) gezeigt^[19]. Dabei wird I_2 an aromatische Gruppen, wie sie in den Aminosäuren Tyrosin und Histidin vorkommen, addiert^[140]. Bei gleichmäßiger Iodierung entsteht dadurch eine homogene Verteilung des Iods im Gewebe sowohl bezüglich der Oberfläche als auch der Tiefe des Gewebes. Damit kann Iod als künstlicher interner Standard nicht nur zum Ausgleich der kurzfristigen Signalschwankungen und der längerfristigen Drifts – verursacht durch die Messgeräte – genutzt werden, sondern auch, um Variationen in der Gewebedicke und -dichte auszugleichen.

Ein großes Problem ist aber in den meisten Fällen sicher die unterschiedliche Elementfraktionierungen des internen Standards – wie vor allem bei der Verwendung von ^{13}C als interner Standard – und des Analyten. Diese werden durch verschiedenen Siede- bzw. Schmelzpunkte und unterschiedliche Bindungsenthalpien des internen Standards und des Analyten innerhalb der Probe verursacht. Sie entstehen während der Ablation^[141, 142], beim Transportprozess^[143] und in der Interface Region^[144]. Daher ist es notwendig einen internen Standard zu finden, der sich während der Ablation, beim Transport, im Plasma und im Interface ähnlich wie der Analyt verhält.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bereits verschiedene interne Standards in der Literatur beschrieben wurden, wobei verschiedene Autoren teilweise zu widersprüchlichen Ergebnissen kamen – z. B. bezüglich der Eignung von ^{13}C als internen Standard. Klar ist jedoch, dass für jede Matrix ein eigener Standard gefunden und hinsichtlich seiner Eignung überprüft werden muss.

Für diese Arbeit soll die Eignung von essentiellen im Modellorganismus bereits vorhandenen Elementen (z. B. Magnesium, Calcium, Kupfer) und von Elementmarkierungen (z. B. über künstlich eingebrachtes Iod) zum Ausgleich von Gewebeinhomogenitäten sowie kurzfristigen und längerfristigen Signalschwankungen geprüft werden. ^{13}C wird als potentieller interner Standard für die Messung von Gd in biologischem Gewebe untersucht. Ein Standard zum Ausgleich von Gerätedriften kann ebenfalls ein Element in einer Matrix sein, die sich von der zu untersuchenden Matrix unterscheiden kann (z. B. Barium im Glasobjektträger). Die Voraussetzung für eine richtige Driftkorrektur ist dann, dass das Element homogen in der Matrix vorliegt. Zur Kalibrierung wird das entsprechende Element in definierten zeitlichen Abständen während der Messung des Analyten in der zu untersuchenden Matrix gemessen werden.

2.1.6.2.2 Quantifizierungskonzepte und Kalibrierung

Für die Entwicklung eines Quantifizierungskonzeptes müssen auch die Matrixeffekte berücksichtigt werden. Diese können – ähnlich wie die Elementfraktionierungseffekte – während der Ablation, des Transportprozesses und im Plasma entstehen. Daher ist es notwendig ein matrixangepasstes Kalibrierungskonzept zu entwickeln^[26]. So können Matrixeffekte, die auch einen Einfluss auf die Elementfraktionierungseffekte haben, ausgeglichen werden. Für die Quantifizierung von Analyten in einer Matrix können entweder zertifizierte Referenzmaterialien aus der gleichen Matrix mit einem bekannten Analytgehalt oder selbst hergestellte matrixangepasste Standards dienen.

Mit den verfügbaren biologischen zertifizierten Referenzmaterialien (ZRMs) wurden bisher Analysen durch Ein-Punkt-Kalibrierungen z. B. in Schweineleber als ZRM für die Bestimmung von Cd, Cu, Zn, Mo und Pb in Schafsleber, Schafsniere und Schweineleber durchgeführt^[31, 95]. Dabei wurden Wiederfindungsraten von 86 – 124 % bestimmt. Auch Mehr-Punkt-Kalibrierungen auf verschiedenen ZRMs in Form gefriergetrockneter Pulver wurden veröffentlicht^[93]. Quantifiziert wurden dabei Cu, Zn und Fe in Rattenhirn. Die RSDs von vier Kalibrierungen lagen unter 10 %. Die Übertragbarkeit ist hierbei allerdings nicht gewährleistet.

Für die Untersuchung verschiedener Metalle in Baumringen wurde zur Kalibrierung gespikte Cellulose, die anschließend zu Pellets gepresst wurde, verwendet^[91]. Die Gehalte konnten für alle Analyten mittels ICP-MS nach Aufschluss der Pellets innerhalb der Fehlergrenzen bestätigt werden.

Auch der Vergleich eines ZRMs aus Muschel-Gewebe und einem hergestellten Standard aus Meeresschnecken diente als Grundlage für die quantitative Analyse von Meeresschnecken und Muschelgewebe^[102]. Es wurden vier verschiedene Quantifizierungsstrategien getestet und mittels ICP-MS nach einem Aufschluss der Gewebe überprüft:

1. Durch die semi-quantitative Analyse über eine Ein-Punkt-Kalibrierung mit einem ZRM wurden relative Empfindlichkeitskoeffizienten (RSC) zwischen 0.4 und 2.7 erreicht.

Die Ansätze für die quantitativen Spurenelementanalysen sehen wie folgt aus:

2. Für die Kalibrierung wurden synthetische Laborstandards aus dem zertifizierten Muschel-Gewebe BRC 278 durch Spiken mit bekannten Analytmengen hergestellt. Die Mischungen wurden getrocknet, gepresst und der Gehalt mittels ICP-MS nach einem Mikrowellenaufschluss bestimmt.

3. Matrixangepasste synthetische Laborstandards aus gespiktem Referenz-Schnecken-Gewebe wurden homogenisiert, zentrifugiert, gefriergetrocknet und geschnitten.
4. Das vierte Quantifizierungskonzept beruht auf der Verwendung von synthetischen Laborstandards bestehend aus gespiktem Rattenhirn-Gewebe, das genau wie in 3. vorbereitet wurde.

Sowohl die Analyten im Muschel- als auch im Schnecken-Gewebe konnten mit den drei Quantifizierungsmethoden innerhalb bzw. nahe der Fehlergrenzen bestimmt werden. Für die semiquantitative Ein-Punkt-Kalibrierung wurde meist ein Überbefund ermittelt^[102].

Die Bestimmung verschiedener essentieller Elemente in *Elsholtzia splendens* (Culturanter Lippenblütler) erfolgte durch Kalibrierung mittels Standardaddition auf einem ZRM aus Apfelbaumblättern^[39, 40]. Validiert wurde mit einem ZRM aus Pfirsichbaumblättern.

Die ersten quantitativen Elementverteilungen mit eigenen, im Labor hergestellten Standards wurden von Becker *et al.* veröffentlicht^[84, 85]. Die gespikten Standards wurden für die Quantifizierung von Spurenelementen in Gewebeschnitten von menschlichem und Rattenhirn verwendet. Dieses Vorgehen zur Quantifizierung wurde erfolgreich mehrfach auf neurologisches Gewebe^[82, 89, 98, 106, 107] oder anderes biologisches Material angewendet^[81, 83, 105].

Eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung bietet die online Aerosoladdition. Dabei wird während des Ablationsprozesses eine bekannte Menge an analythaltiger Lösung eingesprüht^[145, 146]. Die Addition des Aerosols kann dabei vor^[147] oder nach^[148] der Ablationskammer erfolgen.

Die Quantifizierung durch Isotopenverdünnungsanalyse ist möglich aber schwierig, da eine Homogenisierung des isotopenangereicherten Standards mit der intakten Probe nicht möglich ist^[25, 149, 150]. Die Analyse von biologischem Bulkmaterial mittels LA-ICP-MS wurde schon beschrieben. Dabei wurden entweder die Feststoffe mit isotopenangereicherter Lösung homogenisiert und gepresst^[87, 151, 152], oder die gespikten Presslinge flüssig extrahiert und für die Analyse auf eine Zellulose-Membran getropft^[153]. Auch verashtes Material wurde untersucht^[86].

Für diese Arbeit wurde von der Möglichkeit, die Modellorganismen mechanisch zu homogenisieren und zu Pellets zu pressen, abgesehen. Durch das mechanische Homogenisieren und den Druck beim Pressen werden viele Eigenschaften der Probe stark verän-

dert, wodurch die Ablation beeinflusst wird. Entscheidend dabei sind die Reflektivität, die Wärmeleitfähigkeit, die Dichte, die Zusammensetzung und die Oberflächencharakteristika^[25, 154, 155]. Damit kann ein Modellorganismus nur bedingt mit einer gepressten Probe verglichen werden.

Die entwickelte matrixangepasste Kalibriermethode besteht darin, unbelastete (kontrastmittelfreie) Matrix mit unterschiedlich konzentrierten Gd-Lösungen mit geringen Volumina (z. B. 1 µl) zu betropfen. Nach dem Eintrocknen der Tropfen können nun die Rückstände auf der Matrix (z. B. Kresseblatt) mittels LA-ICP-MS ablatiert und detektiert werden. Anschließend wird aus den Mittelwerten oder Integralen der jeweiligen Messungen der verschiedenen konzentrierten eingetrockneten Tropfen die Steigung berechnet werden. Über diese Steigung soll der Gd-Gesamtgehalt und auch der Gehalt von Gd in jedem einzelnen Pixel eines separat gemessenen exponierten Modellorganismus berechnet werden.

2.2 Röntgenfluoreszenzanalyse mit Synchrotronstrahlung

Die Röntgenfluoreszenzanalyse ist ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Elementanalyse, das die Möglichkeit bietet Elementverteilungen in festen, pulverförmigen und flüssigen Proben zerstörungsfrei bildlich darzustellen.

2.2.1 Grundprinzip

Beim Auftreffen energiereicher Photonen aus einer Strahlungsquelle (Strahlenergie) auf die Probe werden Rumpfelektronen (K- & L-Schale) aus den Atomen herausgeschlagen (Abbildung 10). Beim Auffüllen der Vakanzen durch Elektronen aus höher liegenden Energieniveaus (L- oder M-Schale) werden Röntgenquanten emittiert, deren Energie der Differenz der Energieniveaus entspricht ($\Delta E = E_{\text{Rumpfelektron}} - E_{\text{äußeres Elektron}}$). Je nachdem welches Elektron durch den äußeren Impuls aus dem Atomrumpf geschlagen wurde, entstehen eine Vielzahl elementspezifischer Emissionslinien, die wellenlängendispersiv oder energiedispersiv detektiert werden können.

Für eine charakteristische Emission von Röntgenstrahlung müssen grundsätzlich mindestens eine abgeschlossene Elektronenschale und mindestens ein weiteres Elektron vorhanden sein. Prinzipiell können so alle Elemente außer Wasserstoff und Helium zur charakteristischen Emission angeregt werden. Dabei gilt jedoch: Je leichter das Element

ist, desto unwahrscheinlicher ist das Auffüllen der Lücken durch eigene äußere Elektronen. Hinzu kommt, dass die emittierten Röntgenquanten von leichteren Elementen wegen der geringen Energie schnell von der umgebenden Luft mit einem breiten Absorptionsspektrum absorbiert werden, so dass diese nicht den Detektor erreichen.

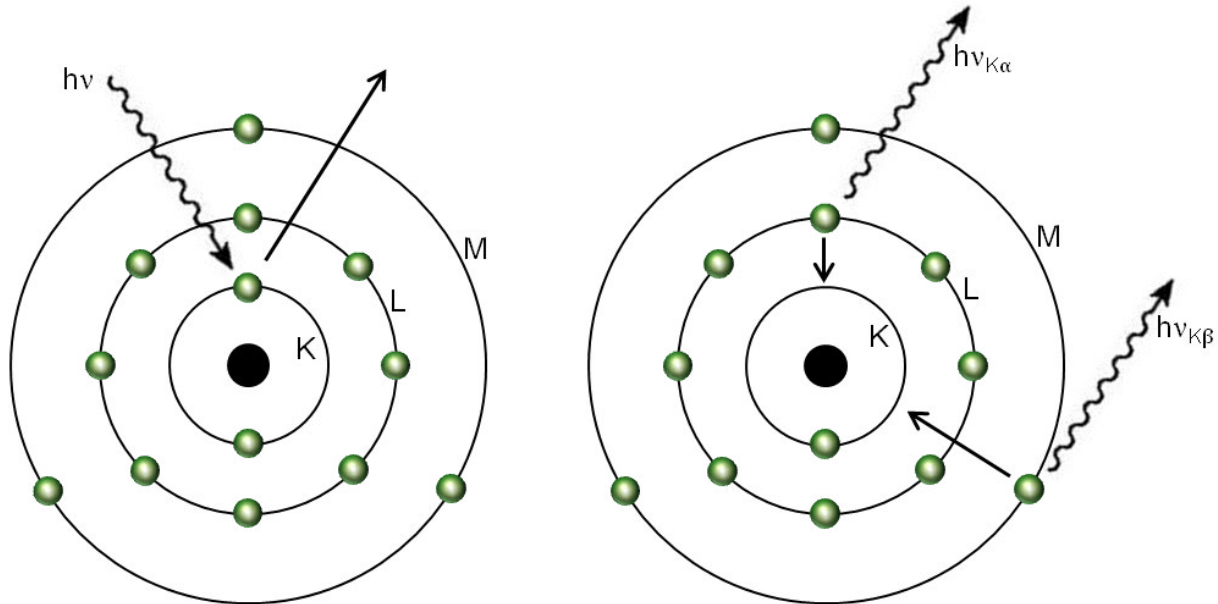


Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung des Grundprinzips der Röntgenfluoreszenzanalyse: Emission charakteristischer Röntgenstrahlung

Die Benennung der jeweiligen Linien erfolgt dabei nach dem Ausgangs- und Endenergiezustand des emittierenden Elektrons. Die Gd-L β -Linie entsteht beispielsweise beim Übergang eines Elektrons aus der N- in die L-Schale eines Gadoliniumatoms (siehe Abbildung 11).

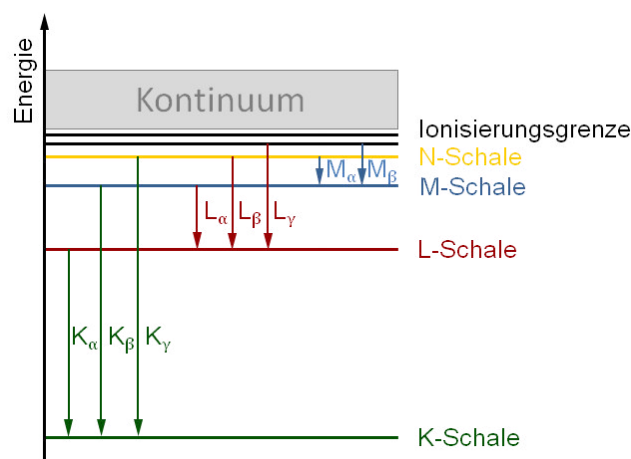


Abbildung 11: Energieschema der Röntgenfluoreszenzübergänge

Röntgenstrahlung kann durch Röntgenröhren, Synchrotronstrahlungsquellen oder radioaktive Nuklide erzeugt werden. In dieser Arbeit wurde für die Erzeugung der Röntgen-

strahlung die Synchrotronstrahlungsquelle von BESSY II (Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung) verwendet.

2.2.2 Synchrotronstrahlung

Synchrotronstrahlung wird von relativistischen Teilchen – Elektronen oder Positronen – tangential zu ihrer Bewegungsrichtung abgegeben, wenn sie sich annähernd mit Lichtgeschwindigkeit bewegen und eine Beschleunigung erfahren. Die Synchrotronstrahlung bietet viele Vorteile: Sie ist über ein breites Frequenzspektrum vom Infrarot bis in den Röntgenbereich kontinuierlich. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit der Elektronen sind die Strahlungsintensität und die Brillanz (Bündelung der Energie elektromagnetischer Strahlung) um mehrere Größenordnungen höher als bei einer Röntgenröhre. Die hohe Brillanz führt durch die erhöhte Photonendichte zu intensiveren Fluoreszenzsignalen. Dadurch können auch mit geringeren Strahlquerschnitten nachweisstarke Messungen vorgenommen werden^[156]. Durch Fokussieren und Abblenden der Strahlung können Spots im μm -Bereich erzeugt werden, so dass nur geringe Probenmengen nötig sind.

Der schematische Aufbau von BESSY II, an dem die SRXRF- und die μ -CT-Messungen stattfanden, in Abbildung 12 zeigt die zur Erzeugung von Synchrotronstrahlung notwendigen Bauteile. Die Elektronenkanone generiert zunächst einen Elektronenstrahl der im Mikrotron beschleunigt wird^[157]. Von dort gelangt er in das Synchrotron, in dem er weiter auf seine Endenergie beschleunigt wird. Durch Ablenkmagnete wird der Elektronenstrahl in den Speicherring befördert, der die Form eines Polygons hat. Im Speicherring befinden sich entweder Undulatoren oder Wellenlängenschieber. Beide bestehen aus Magneten, die den Elektronenstrahl ablenken und anschließend wieder auf seine Bahn führen. An der Stelle mit maximaler Auslenkung des Strahls ist die Intensität und Energie der tangential abgegebenen Synchrotronstrahlung am größten.

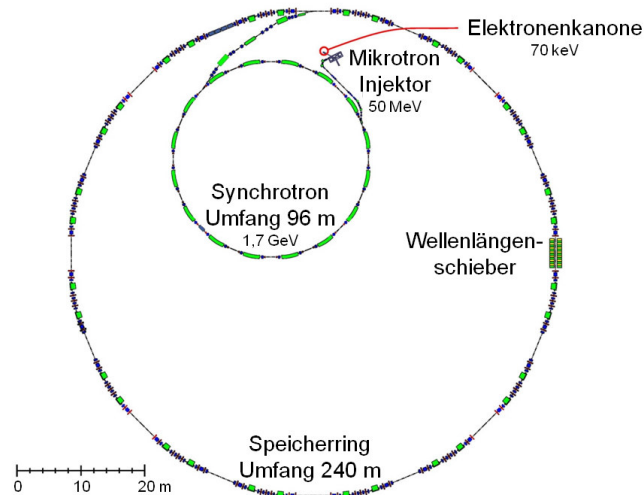


Abbildung 12: Vereinfachter schematischer Aufbau von BESSY II (nach www.helmholtz-berlin.de)

Um den Elektronenstrahl dauerhaft im Ring speichern zu können, ist die Anordnung verschiedener Magnete – Dipole, Quadrupole und Sextupole^[157] – notwendig. Diese Magnete sorgen für die kreisförmige Bahn, eine Fokussierung entlang des Querschnittes und der Bewegungsrichtung^[157]. Anschließend passiert der Strahl das Auslasssystem hinter der Strahlenschutzmauer und gelangt über die sogenannten Beamlines rund um den Speicherring zu den jeweiligen Experimentierstationen^[157]. Diese bestehen aus Bleihütten – wie im Fall der *BAMline* – können aber auch offene Stationen sein, wenn ausschließlich weichere Strahlung (bis 10 keV) verwendet wird.

Die Zerlegung der polychromatischen Strahlung in monochromatische gelingt nur durch Beugung an 3d-Punktgittern von Einkristallen. Die Voraussetzung für konstruktive Interferenz wird durch die Bragg-Gleichung beschrieben:

$$n\lambda = 2d\sin(\theta), n > 1 \quad (4)$$

λ Wellenlänge der Röntgenstrahlung

d Abstand zwischen parallelen Gitterebenen

θ Winkel zwischen Röntgenstrahl und Gitterebenen

Beide Monochromatoren (Doppel-Kristall-Monochromator und Doppel-Multilayer-Monochromator) bestehen aus Siliziumkristallen und können einzeln oder in Kombination betrieben werden. Dadurch können die Energieauflösung und die Intensität beeinflusst werden.

Nachdem der Strahl auf die gewünschte Größe fokussiert wurde, passiert er eine Ionisierungskammer, mit Hilfe derer ein Normierungsfaktor erstellt wird, der Intensitätsschwankungen des Strahls ausgleicht.

Die Detektion kann wellenlängendispersiv unter Verwendung von Analysatorkristallen oder energiedispersiv mit Halbleiterdetektoren erfolgen. Innerhalb dieser Arbeit wurde ausschließlich energiedispersiv detektiert. Dabei werden die Elektronenlochpaare, die durch die absorbierten Röntgenquanten auf einem Halbleiter entstehen, gezählt. Die Anzahl der Elektronenlochpaare ist proportional zur Energie des absorbierten Photons. Diese Detektion bietet die Möglichkeit der schnellen, simultanen Erfassung vieler Elemente in einer Probe. Die Peakzuordnung ist relativ einfach, da die verschiedenen Linien jedes Elementes tabelliert sind. Wenn es spektrale Interferenzen einer Linie des Analyten mit einer Linie eines anderen Elementes gibt, kann meist auf eine andere interferenzfreie Linie des Analyten ausgewichen werden. Der Nachteil dieser Detektionsmethode ist die im Vergleich zur wellenlängendispersiven Detektion geringe Energieauflösung von 120-140 eV. Außerdem ist eine Kühlung des Detektors notwendig.

Ein großer Vorteil der Untersuchung von Proben mit der SRXRF ist, dass die Proben zerstörungsfrei untersucht werden können. In Kombination mit anderen Methoden können so neue Verfahren verifiziert bzw. validiert werden. Die Nachweisgrenzen dieses Verfahrens sind allerdings sehr stark von der Matrix und den eingestellten Parametern, wie eingestrahlte Energie, Spotgröße, Messzeit etc., abhängig^[158].

Für die Berechnung der Nachweisgrenzen werden die intensivsten störungsfreien Linien der Elemente im gemessenen spektralen Bereich ausgewählt. Die Berechnung der Nachweisgrenzen erfolgt mit dem folgenden statistischen Ansatz^[159] und wird meist auf 1000 s Messzeit normiert:

$$NG = \frac{3 \cdot \sqrt{\text{Untergrund}}}{\text{Peakfläche}} \cdot \text{Konzentration} \cdot \sqrt{\frac{\text{Messzeit}}{1000s}} \quad (5)$$

Die Methode ist sehr vielseitig einsetzbar. Untersucht werden können viele natürliche Erden^[160] und Gesteine (Fossilien^[161, 162], Keramiken^[163], Tone^[164], Flugasche^[165], Meteoriten^[166, 167]), Gläser^[168], Metalle^[169], und Legierungen^[170] aber auch biologische Proben, wie Knochen^[171, 172], Haare^[173], Zähne^[174] oder Weichgewebe von Menschen^[175],

Tieren^[24] oder Pflanzen^[176, 177]. Außerdem wird die Methode zur Untersuchung von Nahrungsmitteln^[178] genutzt.

2.3 Dreidimensionale μ -Computertomographie mit Synchrotronstrahlung

Auch die zerstörungsfreie dreidimensionale μ -Computertomographie (3D μ -CT) mit Synchrotronstrahlung ist sehr gut für die Untersuchung von schweren Elementen in biologischem Gewebe geeignet. Sie wurde zur Überprüfung und Ergänzung der LA-ICP-MS-Ergebnisse in dieser Arbeit verwendet.

Die μ -CT ist ein durchleuchtendes Verfahren zur bildlichen Darstellung von Objekten mit einer örtlichen Auflösung im μm -Bereich. Dabei wird die Absorption der ausgehenden Röntgenstrahlung gemessen. Die erhaltenen Informationen sind Schwächungskoeffizienten, die durch die Gesamtschwächung der Röntgenstrahlung durch Absorption aller im Strahl vorhandenen Elemente entstehen. Schwere Elemente absorbieren die Strahlung stärker als leichte Elemente.

Die gemessenen Schwächungskoeffizienten sind auf zwei in dieser Messung nicht unterscheidbare Effekte zurückführbar. Der gewünschte Effekt ist die Absorption der Röntgenstrahlung durch alle vorhandenen Elemente. Wie bei vielen anderen Methoden können sich aber auch hier Interferenzen bilden. Diese entstehen, wenn ein Teil des Röntgenstrahls durch den Ein- und Austritt in ein anderes Medium mit verschiedenen Brechungsindices gebrochen wird. An den Grenzflächen der Objekte (auch inneren Strukturen) entstehen so positive wie auch negative Interferenzen der Strahlung. Dieser Effekt wird Kantenüberhöhung genannt und ist auf wenige Pixel im μm -Bereich begrenzt, so dass in Bereichen mit starken Schwächungskoeffizienten, die größer als ein paar Pixel sind, von einer tatsächlichen Absorption ausgegangen werden kann. Da die Röntgenstrahlen lediglich um wenige μm pro m gebeugt werden, kann der Kantenüberhöhungseffekt eliminiert werden, indem einmal mit dem geringsten möglichen Abstand des Detektors zur Probe und einmal im normalen Abstandsbereich ($\approx 100\text{ mm}$) detektiert wird und anschließend die Differenz aus beiden Datensätzen gebildet wird. Jene Prozedur wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt, da sie aufgrund der doppelten Messung einer Probe sehr zeitaufwändig ist. Bei der Phasenkontrast-CT wird der Effekt genutzt, um Medien mit verschiedenen Brechungsindices bildlich darzustellen.

Die Ergebnisse der Computertomographie stellen die Gesamtschwächung aller Elemente im Objekt bildlich dar. Daher können auf einzelne Elemente lediglich durch einen Vergleich mit einem analytfreien Objekt Rückschlüsse gezogen werden.

Bei der dreidimensionalen Computertomographie wird das Objekt in beliebig vielen Schritten um insgesamt 360° gedreht. Von jeder Winkeleinstellung wird das Absorptionsspektrum eines Schnittbildes aufgenommen. Dies dauert einige Stunden und erzeugt ein dreidimensionales Bild der Absorption.

In biologischem Gewebe, dessen Hauptkomponenten leichte Elemente sind, lassen sich schwere Elemente besonders kontrastreich darstellen. Dies ist zwar nicht elementspezifisch, aber in Kombination mit der LA-ICP-MS ist die 3D μ -CT hervorragend geeignet, um die dreidimensionale Verteilung von Gadolinium in biologischem Gewebe aufzuklären. In der Literatur fand die 3D μ -CT bereits zur quantitativen Bestimmung des Wachstums von Bodenpilzen^[179], zur anatomischen Bestimmung von unterschiedlichen Geweben in der Knolle von Scheiden-Wollgras^[180] oder zur Unterscheidung der Wurzeln wachsender Pflanzen vom Nährboden Anwendung. Die Computertomographie mit Röntgenstrahlung kann aber auch vielseitig in anderen Bereichen, wie der Biologie^[181], Histologie^[182], Paläontologie^[183], Geologie^[184] und vielen anderen eingesetzt werden.

3. Untersuchte Modellorganismen

Für die Untersuchung der Aufnahme gadoliniumhaltiger Kontrastmittel von lebenden Organismen mittels LA-ICP-MS wurden in dieser Arbeit die Fadenalge (*Zygnema*), die kleine Wasserlinse (*Lemna minor*), die Gartenkresse (*Lepidium sativum*) und der große Wasserfloh (*Daphnia magna*) ausgewählt (Abbildung 13), da sie klein genug sind, um in vertretbarer Zeit (2 – 6 h) aus dem gesamten Organismus detaillierte Informationen (50 µm Spotgröße) zur Verteilung der gadoliniumbasierten Kontrastmittel bzw. von Gadolinium mittels LA-ICP-MS erhalten zu können. Außerdem sind diese Organismen relativ einfach und schnell in größeren Mengen zu züchten, bzw. zu kultivieren.



Abbildung 13: Photos der Modellorganismen; von links nach rechts: Fadenalgen (*Zygnema*), Wasserlinsen^[185] (*Lemna minor*), Gartenkresse^[186] (*Lepidium sativum*), Wasserfloh (*Daphnia magna*)

Die Aufnahme gadoliniumbasierter Kontrastmittel wurde an den oben genannten Modellorganismen Fadenalgen, Wasserlinsen, Wasserflöhe und Kresse mittels LA-ICP-MS, µ-CT und SRXRF untersucht. Für die Methodenentwicklung wurden wesentlich höhere Konzentrationen verwendet, als sie in der Natur zu erwarten sind, um oberhalb der Nachweisgrenzen der verwendeten Methoden gut sichtbare Signale nach relativ kurzer Expositionszeit zu erhalten. Bisher sind keine Studien bekannt, die die Korrelation zwischen dem Aufnahmeverhalten der Gd-basierten Kontrastmittel von Lebewesen und den typischen Umweltkonzentrationen zeigen. In dieser Arbeit wird angenommen, dass die beobachteten Effekte auch bei den geringeren in der Umwelt vorhandenen Konzentrationen erkennbar sind.

3.1 Wasserpflanzen – Fadenalge – *Zygnema*

Algen sind photosynthetisch aktive, freischwimmende oder festgewachsene, einzellige oder mehrzellige, eukariotische Lebewesen, die im Meer, Süßwasser oder an feuchten Orten vorkommen. Fadenalgen im Speziellen gehören zur Gruppe der Grünalgen und bilden lange, fädige Strukturen. Sie betreiben Photosynthese und brauchen Licht und CO₂.

Da Wasserpflanzen ihre Nährstoffe über die gesamte Oberfläche aufnehmen, sind die Fadenalgen als Vertreter gut geeignet, um zu überprüfen, ob sie eine Wechselwirkung mit den gadoliniumbasierten Kontrastmitteln eingehen.

3.2 Schwimmpflanzen – Wasserlinse – *Lemna minor*

Die kleine Wasserlinse (*L. minor*) gehört innerhalb der Ordnung der Froschlöffelartigen zur Familie der Aronstabgewächse und Unterfamilie der Wasserlinsengewächse. Da die Wasserlinse zu den Wasserpflanzen gehört, nimmt sie ihre Nährstoffe nicht nur über die Wurzeln, sondern hauptsächlich über die Blattoberfläche auf. Zum Schwimmen bildet sie unter ihren Blättern einen mit Luft gefüllten Hohlraum. Der direkte Kontakt mit dem Nährmedium besteht daher eher an den Blatträndern. Die Wurzelfäden dienen vorwiegend der Stabilisierung. An diesem Modellorganismus soll untersucht werden, ob eine Aufnahme (Ab- bzw. Adsorption) von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln durch Wasserlinsen möglich ist.

3.3 Landpflanzen – Kresse – *Lepidium sativum*

Die Gartenkresse zählt zu den einjährigen Kulturpflanzen und innerhalb der Familie der Kreuzblütengewächse zur Gattung der Kressen. Die krautartigen Pflanzen erreichen Wuchshöhen von maximal 30 – 50 cm. Die Stängel sind kahl, hellgrün-bläulich und nach oben hin verzweigt.

In den vorgestellten Experimenten wurde die Kresse bereits einige Tage nach der Keimung geerntet, so dass hier die Keimlinge mit ihren Keimblättern untersucht wurden. Die Keimblätter befinden sich paarweise, einander gegenüber am oberen Ende des Stängels. Da die Kresse keine besonderen Ansprüche stellt, kann sie ganzjährig auf mageren Substraten, wie z. B. Watte oder Sand, kultiviert werden. Die Kresse eignet sich also besonders gut für die störungsfreie Untersuchung hinsichtlich der Aufnahme gadoliniumhaltiger Kontrastmittel über die Wurzeln.

3.3.1 Stoff- und Wassertransport in Landpflanzen

Um zu verstehen, wie eine Landpflanze das gadoliniumbasierte Kontrastmittel als körperfremden oder auch fälschlich erkannten körpereigenen Stoff transportieren könnte, wird im folgenden Abschnitt der Wasser- und Stofftransport in Landpflanzen – wie der Kresse – beschrieben.

3.3.1.1 Wassertransport

Die Richtung des Wassertransports im Boden und auch in der Pflanze hängt vom Wasserpotential ab. Dieses setzt sich additiv aus dem mechanischen Druck (positiv oder negativ) und dem chemischen Potential der gelösten Substanzen (immer negativ) zusammen. Das Wasser bewegt sich prinzipiell von hohen zu geringen Potentialen.

Zunächst wird das Wasser wegen des geringeren Wasserpotentials im Vergleich zur Umgebung von den Wurzelhaaren aufgenommen (Abbildung 14 oben). Auch innerhalb der Wurzel herrscht ein Potentialgefälle mit den niedrigsten Potentialen im Zentralzylinder (Haupttransportweg). Bis zum Casparischen Streifen bewegt es sich im apoplastischen Raum (interzellulärer Raum + Zellwände). Der Casparische Streifen ist eine Membran aus Lignin und Endodermin in der Endodermis und blockiert den Wassertransport durch diesen apoplastischen Raum zum Zentralzylinder der Wurzel. Das Wasser muss – um in den Zentralzylinder zu gelangen – den symplastischen Raum (intrazellulärer Raum) der Endodermis passieren. Ab hier erfolgt der Langstreckentransport des Wassers über zwei mögliche Mechanismen: den Wurzeldruck (aktiv) und den Transpirationssog (passiv). Der Wurzeldruck entsteht dadurch, dass das Wasser aus dem Zentralzylinder durch den Casparischen Streifen (siehe III-3.3.2 Schutzmechanismus von Pflanzen bei der Aufnahme von Substanzen) nicht wieder zurück in die Rinde fließen kann. Der Druck bewirkt, dass das Wasser im Xylem nach oben in die Richtung der Blätter transportiert wird. Der Transpirationssog entsteht durch die Abgabe von Wasserdampf aus den Spaltöffnungen der Blätter. Dies hat ein negatives Potential zur Folge, dass die Sogwirkung verursacht.

3.3.1.2 Transport von Assimilaten

Der Transport der gebildeten Assimilate (umgewandelte körperfremde in körpereigene Stoffe, z. B. Saccharose) geschieht über das Phloem im Zentralzylinder vom Ort der Bil-

derung zum Ort des Verbrauchs. Dabei erfolgt die Beladung des Phloems aktiv, während der Transport druckgetrieben abläuft.

3.3.1.3 Exkretion und Sekretion

Die Ausscheidung von Substanzen erfolgt über das sogenannte Ausscheidungsgewebe und dient beispielsweise der Kommunikation mit Tieren (z. B. Lockstoff, Abwehr oder Gift), oder Pflanzen (z. B. Vertreibung von anderen Pflanzenarten durch Vergiftung des Bodens: Walnussbaum, Warnung vor Fraßfeinden: Akazie), oder zur Infektionsabwehr (Harz zum Wundverschließen und zur Desinfektion). Die Abgabe der zielgerichtet gebildeten Substanzen kann gasförmig (Verdunstung), flüssig (Milch, Harz) oder fest (Pflanzenteile, Verrottung von Pflanzen oder Pflanzenteilen) erfolgen.

3.3.2 Schutzmechanismus von Pflanzen bei der Aufnahme von Substanzen

Da in dieser Arbeit die Aufnahme von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln durch Pflanzen untersucht wird, soll die Frage nach einem natürlichen Schutzmechanismus einer Landpflanze geklärt werden. Im Normalfall schützt sich die Pflanze vor zu großen Molekülen und einer unkontrollierten Aufnahme von Substanzen – auch Wasser – durch den Casparischen Streifen (Abbildung 14). Dieser zwingt alle aufzunehmenden Substanzen in den symplastischen Raum (Abbildung 14 unten links und rechts), wo sie – bevor sie im Zentralzylinder transportiert werden – selektiert werden.

Die Aufnahme und Verteilung von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln wurden in dieser Arbeit anhand von Kressekeimlingen untersucht. Bei diesen jungen Pflanzen bzw. wachsenden Wurzeln ist der Casparische Streifen noch nicht vollständig ausgebildet^[187], so dass Substanzen über den apoplastischen Raum in den Zentralzylinder aufgenommen werden können^[188].

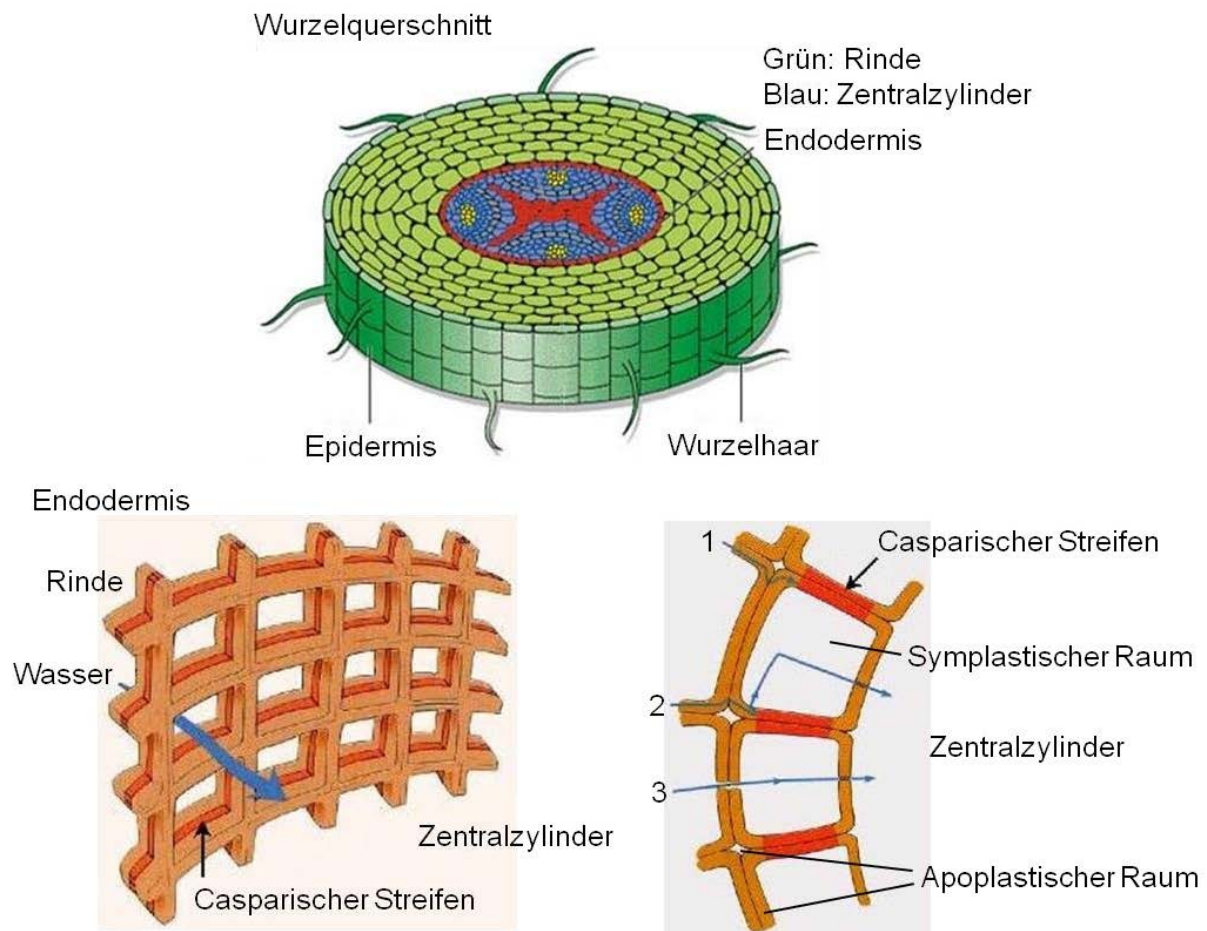


Abbildung 14: oben: Schematische Darstellung eines Wurzelquerschnitts, unten links & rechts: Stofftransportes durch die Zellen von der Rinde zum Zentralzylinder am Casparischen Streifen vorbei; 1, 2 und 3 beschreiben schematisch die möglichen Wege in der Endodermis: Den 1. Weg durchläuft eine Substanz, die vom Casparischen Streifen in der Endodermis aufgehalten wird und dadurch nicht in den Zentralzylinder gelangen kann. Auf dem 2. Weg werden Substanzen transportiert, die sich im apoplastischen Raum befinden und die nicht im symplastischen Raum selektiert werden. Beim 3. Weg findet der Stofftransport vor und nach dem Casparischen Streifen innerhalb des symplastischen Raumes statt. frei nach ^[189] & ^[190]

3.4 Aquatische Fauna – Wasserfloh – *Daphnia magna*

Der große Wasserfloh (*Daphnia magna*) wird als höherer Organismus genutzt, um die Aufnahme und Verteilung von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln in der aquatischen Fauna beispielhaft zu analysieren. Im Zusammenhang damit wird überprüft, ob durch eine Wechselwirkung der Daphnien mit dem Kontrastmitteln Gadolinium durch die Daphnien über Fische in die menschliche Nahrungskette gelangen kann.

Daphnien zählen zur Gattung der Krebstiere. Sie sind von einer zweilappigen facettierten Schale umschlossen, die nur die zwei Antennenpaare freilässt (Abbildung 15). Die

Ruderantennen dienen der Fortbewegung. Das andere Antennenpaar führt die Nahrung in den Schlund. Diese wird zuvor mit den fünf Beinpaaren über die Bauchrinne transportiert und gefiltert. An den Beinpaaren sitzen die Kiemen, mit denen die Daphnie Sauerstoff aus dem Wasser aufnehmen kann. Sie kann aber auch über ihre gesamte Körperoberfläche Sauerstoff aufnehmen.

Daphnien besitzen ein großes Komplexauge, das sie mit sechs Muskeln bewegen können. Ein weiteres Auge, das Naupliusauge, wird im Larvenstadium gebildet und liegt direkt über dem Cerebralganglion, einer Ansammlung von Nervenzellen. Das Herz einer Daphnie schlägt etwa vier Mal pro Sekunde und ist nicht mit einem Gefäßsystem verbunden. Die Körperflüssigkeit wird auf der einen Körperseite eingesaugt und zur anderen Seite wieder ausgestoßen, so dass die Körperflüssigkeit ständig zirkuliert.

Daphnien passen sich hinsichtlich ihrer Fortpflanzung gut an die jeweils aktuellen Bedingungen in der Umwelt an. Unter günstigen Lebensbedingungen bilden sie parthenogenetisch (aus unbefruchteten Keimzellen) nährstoffarme Eier, aus denen ausschließlich identische Weibchen schlüpfen. Unter ungünstigen Bedingungen werden Männchen gebildet, die dann nährstoffreiche sog. Dauereier befruchten. Diese Eier können Jahrzehnte in Sedimenten überdauern. Erst wenn sich die Bedingungen verbessern schlüpfen aus den Eiern Jungtiere.

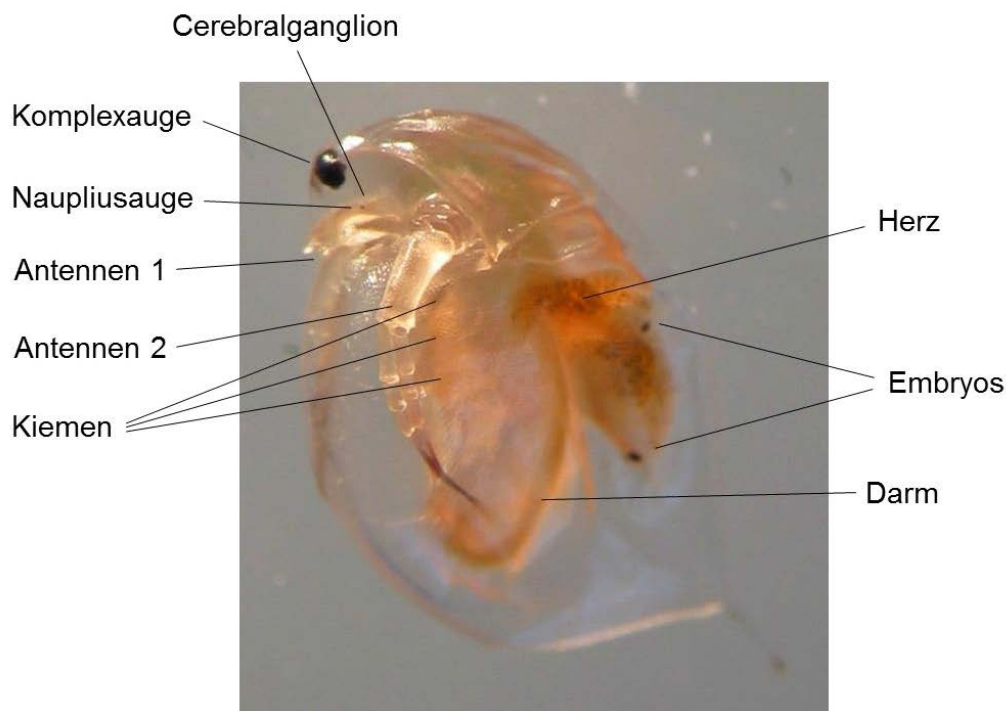


Abbildung 15: Lichtmikroskopaufnahme einer Daphnie mit Benennung der Körperteile

III EXPERIMENTELLER TEIL

In dieser Arbeit wurden die ICP-MS, die SRXRF und die 3D μ -CT als analytische Methoden zur Bildgebung verwendet. Die ICP-MS wurde sowohl mit einer Laserablationszelle als auch mit einem Flüssigprobeneintragssystem gekoppelt. Zur bildgebenden Untersuchung der biologischen Proben wurde die LA-ICP-MS eingesetzt. Mit Hilfe der SRXRF und der 3D μ -CT wurden diese Ergebnisse verifiziert bzw. ergänzt. Im Folgenden werden die verwendeten Messparameter jeder Methode sowie die Präparation der Proben dargestellt.

1. Geräte und Chemikalien

1.1 LA-ICP-MS

Für die Untersuchung der Modellorganismen wurde das Laserablationssystem New Wave 213 von ESI (Portland, Oregon, USA) mit einem UV-Laser (Wellenlänge 213 nm, Pulsdauer 3-5 ns) verwendet. Das genutzte ICP-MS Element XR stammt von Thermo Fisher Scientific (Bremen, Deutschland). Tabelle 4 zeigt die verwendeten Einstellungen und Messparameter, die für die Untersuchung der Proben mittels LA-ICP-MS verwendet wurden.

Die meisten Messungen in dieser Arbeit wurden mit der LA-ICP-MS durchgeführt, die einer sorgfältigen Optimierung der instrumentellen Parameter und der Messbedingungen bedarf. Dazu wurde das ICP-MS einmal wöchentlich mit einer Na-, In- und U-enhaltenden Lösung mit Konzentrationen von jeweils $1 \mu\text{g l}^{-1}$ hinsichtlich der Intensität (Intensität für $^{115}\text{In} \geq 1\,000\,000 \text{ cps}$) und der Signalstabilität ($\text{RSD} \leq 2 \%$) optimiert. Außerdem wurden am gesamten LA-ICP-MS-System täglich die Gasflüsse (am ICP Argon und am Laserablationssystem Argon und Helium), die Plasmafackelposition, die Einstellungen der Ionenlinsen, und bei Bedarf auch die Detektorspannung hinsichtlich Intensität und Stabilität ($\text{RSD} \leq 5 \%$) von ^{137}Ba in einem Glasobjektträger optimiert. An einer separaten Parallelprobe wurden zusätzlich die Laserspotgröße, die Scangeschwindigkeit und die Bestrahlungsstärke so optimiert, dass trotz der hohen Auflösung eine hohe Empfindlichkeit gewährleistet werden konnte. Für die Messungen der Intensitätsverteilung wurde das ICP-MS über den externen Trigger-Modus mit dem Laser gekoppelt. Vor jedem Linienscan wurde 30 s lang der Gasblindwert gemessen.

Tabelle 4: Optimierte Messparameter für die LA-ICP-MS

Laser	New Wave NWR-213
Wellenlänge [nm]	213
Transportgas He [l min ⁻¹]	1.0
Bestrahlungsstärke [J cm ⁻²]	0.7 – 23.5
Wiederholrate [Hz]	20
Laserspotgröße [µm]	4 – 50
Scangeschwindigkeit [µm s ⁻¹]	10 – 50
Abstand zwischen benachbarten Linien	Laserspotgröße – 10 %
Messung des Gasblindwerts [s]	30
Pause zwischen den Scans [s]	2-20
ICP-MS	Element XR
RF Power [W]	1150 – 1375
Sample und Skimmer Konus	Nickel
Scan Mode	E- & B-Scan
Plasmagas Ar [l min ⁻¹]	15
Sample Gas Ar [l min ⁻¹]	0.6 – 0.7
Auxiliary Gas Ar [l min ⁻¹]	0.8 – 1.0
Massenauflösung m/Δm	~ 300 & ~ 4000
Ausgewählte Isotope	¹³ C, ²⁵ Mg, ⁴⁴ Ca, ⁶³ Cu, ¹¹² Cd, ¹²⁷ I, ¹³⁷ Ba, ¹⁴¹ Pr, ¹⁵⁸ Gd
Messungen pro Peak	10
Dwell Time [ms]	10

Die erhaltenen Daten aus den Einzellinienscans sind Intensitätsverteilungen bezüglich der Zeit. Über Microsoft Excel wurden nach dem Abzug des Gasblindwertes die Scangeschwindigkeit und die Nummer des Linienscans in eine Millimeterskala konvertiert. Mit Origin 9.0 wurde anschließend das Intensitätsverteilungsbild erstellt. In der Farbkodierung entspricht die Farbe Blau geringen und Rot bzw. Weiß hohen Intensitäten, wobei in weißen Bereichen die Intensitäten oberhalb der dargestellten Skala liegen.

1.2 ICP-MS mit einem Flüssig-Probeneintragssystem

Zur Bestimmung des Gd- bzw. Pr-Gehaltes in flüssigen Proben wurden zwei verschiedene Massenspektrometer verwendet: zum einen das Sektorfeld-MS Element XR und zum anderen das Quadrupol-MS iCAP Q (Tabelle 5). Beide Geräte sind von Thermo Fisher Scientific (Bremen, Deutschland).

Vor den jeweiligen Messungen wurden beide Geräte wie oben beschrieben über eine Na-, In- und U-enhaltende Lösung in den Konzentrationen von jeweils $1 \mu\text{g l}^{-1}$ optimiert.

Tabelle 5: Verwendete Parameter während der Untersuchung der Kresse nach Aufschluss mittels ICP-MS

Flüssigeintrag	
am Element XR	Sektorfeld-Massenspektrometer
Sprühkammer	Scott
Zerstäuber	konzentrisch
am iCAP Q	Quadrupol-Massenspektrometer
RF Power [W]	1550
Dwell Time [ms]	100
Cooling Gas Ar [l min^{-1}]	14
Zerstäubergas Ar [l min^{-1}]	1
Auxiliary Gas Ar [l min^{-1}]	0.8
Sprühkammer	Zyklon (gekühlt auf 3°C)
Zerstäuber	konzentrisch

1.3 SRXRF und μ -CT

Die Untersuchungen mittels Röntgenfluoreszenzanalyse mit Synchrotronstrahlung und die dreidimensionale μ -Computertomographie wurden am BESSY II in Berlin Adlershof durchgeführt (Tabelle 6).

Während der SRXRF-Messungen befand sich die Probe im 45° Winkel zum Primärstrahl und ebenfalls im 45° Winkel zum Detektor (siehe Abbildung 16). Durch ein Langdistanzmikroskop kann über die Bildschärfe der Abstand der Probe zu Quelle und Detektor bestimmt werden.

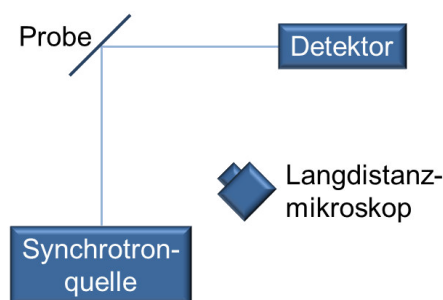


Abbildung 16: Vereinfachte Darstellung der Messanordnung der SRXRF-Messungen

Die SRXRF-Daten wurden mithilfe der Software QXAS (Quantitative X-Ray System, International Atomic Energy Agency, IAEA, Wien, Österreich) ausgewertet.

Während der 3D μ -CT wurde alle 100 Spektren ein sogenanntes Flatfile gemessen. Dazu wurde ein Spektrum der Luft ohne die Probe aufgenommen. Diese Daten wurden zur Untergrundkorrektur verwendet. Anschließend wurde die für diese Methode übliche gefilterte Rückprojektion^[182, 191] der vorkorrigierten Daten zur Darstellung des dreidimensionalen Bildes durchgeführt.

Tabelle 6: Für die SRXRF verwendete Parameter

Bildgebende Verfahren mit Synchrotronstrahlung	
SRXRF	
Strahlenergie [keV]	9.7 – 10
Detektor	SDD (energiedispersiver Siliziumdrift-detektor, XFlash®, Bruker, Rheinstetten, Deutschland)
Energieauflösung	130 – 150 eV (bei 5.9 keV Mn K α)
3D μ-CT	
Strahlenergie [keV]	9.9
Abstand Probe – Detektor [cm]	10
Zahl der Winkel	900 – 1200
Messzeit pro Ebene [s]	3.7 – 4.5
Detektor	PCO 4000 (gekühlte CCD-Kamera, PCO, Kelheim, Deutschland)

1.4 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Hersteller sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gd-Blech	Goodfellow, Bad Nauheim, Deutschland
Gd-DOTA	Guerbet, Sulzbach, Deutschland
Gd-DTPA	Bayer-Schering-Pharma, Berlin, Deutschland
Gd-DTPA-BMA	GE Healthcare Buchler GmbH, Braunschweig, Deutschland
DOTA	abcr, Karlsruhe, Deutschland
Biotin	Fluka, Buchs, St. Gallen, Schweiz
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ca-Standard	Merck, Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland

Cd-Standard	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\text{CdSO}_4 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cu-Standard	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fe-Standard	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gd-Standard	Merck, Darmstadt, Deutschland
H_3BO_3	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES-Puffer	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
HNO_3	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
H_2O_2	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
I_2	Österreichischer Verein für Chemische und Metallurgische Produktion, Königreich Böhmen & Tschechoslowakei
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tesafilm®	tesa SE, Hamburg, Deutschland
KH_2PO_4	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland
K_2HPO_4	Merck, Darmstadt, Deutschland
KI	Merck, Darmstadt, Deutschland
Laser Ablation-Multi-Lanthanide Ink	Proteome Factory, Berlin, Deutschland
LiCl	Ferak Berlin GmbH, Berlin, Deutschland
Mg-Standard	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mn-Standard	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaBr	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\text{Na}_2\text{ETDA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
NaHCO_3	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	VEB Laborchemie Apolda, Apolda, Deutschland
NaNO_3	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na_2SeO_3	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na_2SiO_3	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NeoClear®	Merck, Darmstadt, Deutschland
NH_4VO_3	Merck, Darmstadt, Deutschland
Polystyrolgranulat (Schmelzolan)	Heintze & Blanckertz Wehrheim/Taunus, Deutschland
Pr-Standard	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\text{Pr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Roti Plast (Paraffin)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

RbSO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sand	Merck, Darmstadt, Deutschland
SrCl ₂ · 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Thiamin (HCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vitamin B ₁₂	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
ZnSO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland

Das verwendete deionisierte Wasser wurde einer Milli-Q-Gradient-Anlage (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA; spezifischer Widerstand 18.2 MΩ cm) entnommen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich dieses Wasser oder Leitungswasser verwendet.

2. Nachweisgrenzen mittels aufgetropfter Standards

2.1 Nachweisgrenzen mittels LA-ICP-MS

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen für die Isotope ^{25}Mg , ^{44}Ca , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{114}Cd , ^{141}Pr und ^{158}Gd mittels LA-ICP-MS erfolgte über eingetrocknete Multielementstandardtropfen auf einem untergrundarmen Adhäsionsobjektträger (Superfrost™ Plus, Thermo Fisher Scientific). Dieser hat geringere Blindwerte als das sonst verwendete Klebeband (Tesafilm®, tesa SE, Hamburg, Deutschland), eignet sich allerdings nicht für Modellorganismen, da diese nicht darauf haften bleiben. Zur Minimierung von Kontaminationen wurde die Präparation in einer Laminar-Flow-Box durchgeführt. Die Konzentrationsreihen wurden aus den Elementen in Form ihrer gelösten Nitrate (Mg, Ca, Mn, Fe, Cu und Cd) bzw. Oxide (Pr und Gd) hergestellt. Zur Stabilisierung der gelösten Salze wurde allen Lösungen 1 % konzentrierte HNO_3 zugesetzt. Um die eingetrockneten Tropfen auf dem Objektträger sehen zu können, wurde zu allen Verdünnungen die gleiche Menge Bromphenolblau-Lösung gegeben.

Von der Multielementstandardlösung wurden je 1 μl Tropfen in sieben Konzentrationen (10 mg Gd l^{-1} , 5 mg Gd l^{-1} , 2.5 mg Gd l^{-1} , 1.25 mg Gd l^{-1} , 0.63 mg Gd l^{-1} , 0.31 mg Gd l^{-1} und 0.16 mg Gd l^{-1}) aufgetropft, so dass Absolutmengen von 10 ng, 5 ng, 2.5 ng, 1.25 ng, 0.63 ng, 0.31 ng und 0.16 ng Gd entstanden. Zusätzlich wurden vier Blindwerttropfen aus einer Lösung hergestellt, bestehend aus den gleichen Anteilen deionisiertem Wasser, HNO_3 und Bromphenolblau.

Gemessen wurde in nebeneinander liegenden Linienscans mit einer Laserspotgröße von 50 μm , einer Scangeschwindigkeit von 20 $\mu\text{m s}^{-1}$, einer Wiederholrate von 20 Hz und einer Bestrahlungsstärke von 4.3 J cm^{-2} . Für alle Isotope wurden die mittlere Auflösung (~ 4000) verwendet, um Interferenzen abzutrennen.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden dabei nach DIN 32645 (Abschnitt 6) mit folgenden Formeln berechnet:

$$NG = \frac{3s_{BW}}{m} \quad (4)$$

$$BG = \frac{9s_{BW}}{m} \quad (5)$$

NG - Nachweisgrenze

s_{BW} - Standardabweichung der Blindwerte

BG - Bestimmungsgrenze

m - Steigung der Kalibriergeraden

2.2 Nachweisgrenzen mittels SRXRF

Für die Bestimmung der Nachweisgrenzen mittels SRXRF wurden ebenfalls eingetrocknete Multielementstandardtropfen genutzt. Als Probenträger wurden ein 9.5 cm langer und 3.2 cm breiter, rechteckiger Aluminiumrahmen (Innenmaße: 8.2 x 2.0 cm) verwendet. Auf diesen wurde Klebeband geklebt und auf die nicht klebende Seite Multielementstandardlösungen getropft (Abbildung 17).

Zu bestimmen waren die Nachweisgrenzen folgender Elemente: Ca, Fe, Cu, Zn, I, La, Pr, Eu, Gd, Tb, Ho, Er, Tm und Yb. Um spektrale Interferenzen zu vermeiden, wurden diese in sechs unabhängige Elementreihen mit je drei Elementen aufgeteilt:

1: Fe, Cu, Yb	4: Pr, Er, Yb	7: Gd
2: Zn, I, Gd	5: Cu, I, Eu	
3: Ca, La, Tb	6: La, Ho, Tm	

Gadolinium wurde zusätzlich einzeln eingetrocknet (Reihe 7), um auch die interferenzfreie Untersuchung gewährleisten zu können.

Von jeder Kalibrierreihe wurde ein 1 µl Tropfen mit einer Konzentration von 100 µg l⁻¹ auf Klebeband getropft und unter Normalbedingungen eingetrocknet. Diese waren im eingetrockneten Zustand weder mit bloßem Auge noch unter dem Mikroskop sichtbar. Mit Hilfe der Markierungen (zwei Punkte pro Tropfen) und Testmessungen konnten die Analyten wiedergefunden werden. Zur Beurteilung des Untergrunds wurden die Luft und das Klebeband in Luft gemessen.

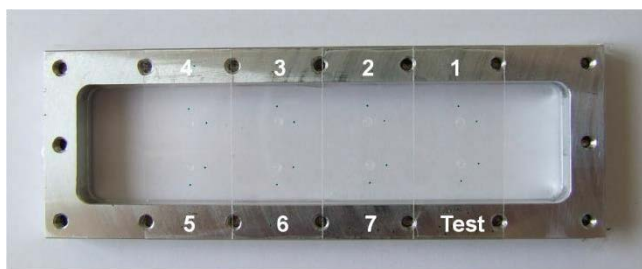


Abbildung 17: Probenträger mit noch nicht eingetrockneten Tropfen der Reihen 1-7 in Konzentrationen von 100 µg l⁻¹ auf Klebeband

Die Strahlenergie für die Messungen betrug 10 keV. Als Spotgröße für die ersten drei Kalibrierreihen (1-3), für die Messung der Luft und des Klebebands wurden 1.0 × 1.4 mm² gewählt. Die Spotgröße für die Elementreihen 4–6 betrug 0.5 × 0.5 mm². Der eingetrock-

nete Tropfen, dem ausschließlich Gd zugesetzt wurde, wurde mit einer Spotgröße von $0.33 \times 0.25 \text{ mm}^2$ gemessen. Die Strahlquelle und der Detektor befanden sich im 45° -Winkel zur Probe und im rechten Winkel zueinander.

3. Wasserpflanzen – Algen (*Zygnema* & *Scenedesmus subspicatus*)

3.1 Aufnahme und Abgabe eines Kontrastmittels durch Fadenalgen

Die untersuchte Fadenalge (*Zygnema*) wurde aus der Zoohandlung Meyer Hoppel und Co. (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Kultivierung der Algen erfolgte im WC-Medium („Woods Hole modified CHU 10“, siehe Tabelle 8).

In einer Gaswaschflasche wurden 200 ml einer Nährlösung (Tabelle 8) mit 50 mg Gd l^{-1} aus Gd-DTPA-BMA (Omniscan®, Gadolinium(III)-5,8-bis(carboxylatome-thyl)-2-[2-(methylamino)-2-oxoethyl]-10-oxo-2,5,8,11-tetraazadodecan-1-carboxylathy-drat) vorgelegt und die gewaschenen Fadenalgen zugegeben. Die Luftzufuhr wurde über eine Membranpumpe geregelt. Nach sieben Tagen wurden die Fadenalgen filtriert und dreimal mit 150 ml Wasser ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) gewaschen, wovon ein Teil anschließend getrocknet und gepresst wurde. Der restliche Teil wurde in 200 ml gadoliniumfreie Nährlösung gegeben. Nach drei Tagen wurden die Fadenalgen entnommen, filtriert, dreimal mit 150 ml Wasser ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) gewaschen, zwischen Löschblättern getrocknet und gepresst.

3.2 Zuchtmedium für Algen

Das WC-Medium^[192] zur Zucht der einzelligen Futteralgen *Scenedesmus subspicatus* für die Wasserflöhe und der Fadenalgen wurde, wie in Tabelle 8 aufgeführt, hergestellt.

III EXPERIMENTELLER TEIL - 3. Wasserpflanzen – Algen (Zygnema & Scenedesmus subspicatus)

Tabelle 8: Einwaagen für das WC-Medium

Stammlösung	Verbindung	Einwaagen [g]	Nährmedium
I	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.68	4 ml Stammlösung I auf 2000 ml Nährmedium
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.702	
	NaHCO ₃	1.260	
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1.140	
	NaNO ₃	8.501	
	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	2.119	
		auf 200 ml	
II Mikronährstoffe	Na ₂ EDTA	4.36	1 ml Stammlösung II auf 2000 ml Nährmedium
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.152	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.010	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.022	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.010	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.180	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.010	
		H ₃ BO ₃	1.000
		auf 500 ml	
III.1 Vitamine	Vitamine	g je 50 ml	auf 50 ml
	Biotin	0.010	
III.2 Vitamine	Stammlösung III.1	100 µl	2 ml Stammlösung II auf 2000 ml Nährmedium
	Thiamin HCl	0.010	
		auf 100 ml	
		HEPES-Puffer	0.201
			auf 2000 ml Nährmedium

4. Schwimmpflanzen – Wasserlinsen (*Lemna minor*)

4.1 Nährmedium für Wasserlinsen

Die Kultivierung der Wasserlinsen erfolgte in einem SIS-Medium (Swedish Standard Institute) nach OECD Guideline 221^[193]. Die Chemikalien wurden, wie in Tabelle 9 beschrieben, eingewogen und auf je 1000 ml für die Stammlösungen I und II aufgefüllt. Das Nährmedium setzt sich zusammen aus 10 ml Stammlösung I und 1 ml Stammlösung II, die auf 2000 ml aufgefüllt wurden.

Alle Experimente mit Wasserlinsen wurden in dieser Nährlösung durchgeführt, um einer Verringerung der Population wegen Nährstoffmangels entgegenzuwirken.

Tabelle 9: Einwaagen für das SIS-Medium

Stammlösung	Verbindung	Einwaagen [g]	Nährmedium
I	NaNO ₃	17.000	
	KH ₂ PO ₄	2.680	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15.000	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	7.200	
	Na ₂ CO ₃	4.000	
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.170	
	Na ₂ EDTA	0.280	
		auf 1000 ml	10 ml Stammlösung I auf 2000 ml Nährmedium
II	H ₃ BO ₃	1.000	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.200	
	Na ₂ MoO ₄	0.010	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.050	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005	
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.010	
		auf 500 ml	1 ml Stammlösung II auf 2000 ml Nährmedium

4.2 Konzentrationsabhängige Aufnahme des Kontrastmittels durch Wasserlinsen

Zehn Wasserlinsen pro Becherglas wurden in 30 ml SIS-Medium kultiviert und mit verschiedenen Konzentrationen Gd-DTPA-BMA (0 mg Gd l⁻¹, 0.1 mg Gd l⁻¹, 1 mg Gd l⁻¹, 10 mg Gd l⁻¹) exponiert. Nach sieben Tagen wurden die Pflanzen mit Wasser

(18.2 M Ω cm) gewaschen und anschließend zwischen Löschpapieren gepresst und getrocknet. Für die LA-ICP-MS wurden die Proben auf der klebenden Seite von Klebeband (TesaFilm®) fixiert, dieses auf einem Glasobjektträger (Thermo Scientific, Deutschland) platziert und in die Ablationszelle des Lasersystems eingeführt.

4.3 Zeitabhängige Aufnahme des Kontrastmittels durch Wasserlinsen

Fünzig Wasserlinsen (*Lemna minor*) pro Becherglas wurden in 30 ml SIS medium kultiviert und mit 10 mg Gd l⁻¹ Gd-DTPA-BMA-Lösung (Omniscan®) über Zeiträume von 0, 1, 2, 5 und 7 Tagen exponiert. Nach der Exposition wurden die Wasserlinsen wie in „III-4.2 Konzentrationsabhängige Aufnahme des Kontrastmittels durch Wasserlinsen“ beschrieben, präpariert.

Die verwendeten Konzentrationen der Kontrastmittel sind im Vergleich zu denen, die in der Natur vorkommen sehr hoch, wurden aber so gewählt, um eine ausreichende Aufnahme in kurzen Expositionszeiten zu gewährleisten.

5. Landpflanzen – Kresse (*Lepidium sativum*)

Da bei den LA-ICP-MS-Analysen der Wasserlinsen nicht eindeutig unterschieden wird, welche detektierten Signale durch aufgenommenes Kontrastmittel und welche durch an der Unterseite der Blätter adsorbiertes Gadolinium – das auch durch das Waschen nicht entfernt werden konnte – verursacht wurden, wurden die weiteren Untersuchungen an einer Landpflanze – der Gartenkresse - durchgeführt. Landpflanzen nehmen das Wasser und die Nährstoffe über die Wurzeln auf. Außerdem können die Blätter, die Stängel und die Wurzeln separat untersucht werden.

Für die folgenden Experimente wurde die Gartenkresse (*Lepidium sativum*) als Modellorganismus für Landpflanzen gewählt, weil diese kleine Blätter, aber trotzdem gut erkennbare Strukturen aufweist. Zudem kann sie schnell und einfach auf nährstoffarmen Substraten gezüchtet werden.

5.1 Kultivierung der Kresse

In Vorbereitung auf die Messungen wurden die Kressekeimlinge unterschiedlich kultiviert. Im Folgenden sind diese Vorbereitungen beschrieben, wobei die Abschnitte dieselben Überschriften tragen, wie die Abschnitte im Ergebnis- und Diskussionsteil, in dem die jeweiligen Resultate vorgestellt und diskutiert werden.

5.1.1 Gesamtbestimmung von Gd nach Aufschluss

Die Kresse wurde für zwölf Tage auf Watte kultiviert und dabei regelmäßig mit Leitungswasser versorgt. Zum Schutz vor Austrocknung wurde ein umgedrehtes Becherglas als Gewächshaus verwendet. Die Exposition fand in Lösung statt, um die genaue Expositionskonzentration bestimmen zu können. Dazu wurde ein mit Gd-DOTA-Lösung (Dota-rem®, Gadolinium(III)-2-[4,7,10-Tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetrazacyclododec-1-yl]-essigsäure) gefülltes Teflongefäß verwendet. Nachdem die Pflanzen vorsichtig aus der Watte herausgelöst wurden, verbrachten sie zwei Tage in dieser Lösung mit einer Konzentration von 10 mg Gd l^{-1} Gd-DOTA-Lösung. Nur die Wurzel und der untere Teil der Stängel hatten dabei direkten Kontakt zur Lösung.

Zum Trocknen wurde die Kresse in ihre Bestandteile zerlegt: Blätter, oberer Stängel, Wurzel. Der Teil des Stängels, der mit der Lösung in Berührung gekommen ist wurde verworfen. Diese Kompartimente wurden dann mit dem Mikrowellen-Hochdruck-

Temperatur-Verfahren aufgeschlossen und die entstandenen Lösungen mit der ICP-MS untersucht. Das Druck-Temperaturprogramm wird in „III-5.3 Mikrowellenaufschlüsse von Kresse“ genauer beschrieben.

5.1.2 Bestimmung der Gd-Verteilung mittels μ -SRXRF und LA-ICP-MS

Die Kressesamen wurden für neun Tage auf kommerziellem Seesand gesät. Der Seesand wurde mit einer Gd-DTPA-Lösung (Magnevist®, Gadolinium(III)-2-[Bis[2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl]amino]essigsäure) mit 100 mg l^{-1} Gd vermischt. Nach der Trocknung enthielt der Sand 10 mg kg^{-1} Gadolinium. Während des Wachstums wurden die Pflanzen täglich einmal mit Leitungswasser gegossen. In diesem Fall wurden neun Tage der Exposition gewählt, damit die Pflanzen eine Mindestgröße erreichen konnten und das Kontrastmittel über die Wurzeln aufnehmen konnten.

Die Samen wurden in Seesand gesät, weil die Pflanzen so über einen ihre gesamte Wachstumsphase – im Vergleich zur Kultivierung auf Watte und anschließender Exposition im flüssigen Medium – exponiert werden konnten; außerdem kann der Gd-Gehalt im Expositionsmedium durch die Vermischung des Sands mit dem Kontrastmittel und anschließende Trocknung eher kontrolliert werden und zum dritten lässt sich die vollständige Pflanze relativ problemlos aus dem Sand – als rieselfähigem Medium – herausnehmen, ohne dass die Wurzel reißen. Dass Gd-Ionen an Sand adsorbieren können ist bekannt^[194]. Ob geringe Verluste des Gd-DTPAs durch Adsorption an Sand möglich sind, ist nicht bekannt, wurden aber aufgrund der beschriebenen Vorteile in Kauf genommen. Zudem ist hier nicht die aufgenommene Menge von entscheidender Bedeutung, sondern ob überhaupt eine Aufnahme stattfindet und wie sich das aufgenommene Gd verteilt.

Nach dem Ernten, wurde die Pflanze zwischen Löschpapieren getrocknet und gepresst und für die SRXRF-Messung zwischen Frischhaltefolie fixiert. Für die LA-ICP-MS-Analyse wurde die oben beschriebene Prozedur (III-3.1 Aufnahme und Abgabe eines Kontrastmittels durch Fadenalgen) angeschlossen.

5.1.3 Bestimmung der Cd- & Gd-Verteilung mittels LA-ICP-MS

Die Kresse wurde acht Tage lang auf Sand kultiviert, der mit 10 mg Cadmium aus $3 \text{ CdSO}_4 \cdot 8 \text{ H}_2\text{O kg}^{-1}$ Sand und 10 mg Gd aus Gd-DTPA kg^{-1} Sand versetzt war. Nach dem

Ernten wurden die Wurzeln gewaschen und die Kresse zwischen Löschpapier getrocknet, gepresst und auf Klebeband für die LA-ICP-MS fixiert.

5.1.4 Überprüfung von Iod als internen Standard

Getrocknete Kresse

Zunächst wurden die Kressesamen auf einem löchrigen Plastikdeckel zum Keimen gebracht. Sobald Wurzeln erkennbar waren, wurden diese einzeln durch die Löcher im Abstand von etwa 1 cm gesteckt. In einem Plastikschälchen darunter befand sich für die ersten 3 Tage eine Gadolinium-freie Lösung und danach für sechs Tage eine 5 mg Gd l⁻¹ Gd-DTPA-Lösung. Ausschließlich die Wurzeln hatten mit den Lösungen Kontakt. Um eine zu starke Verdunstung zu verhindern, fungierte ein umgedrehtes Becherglas als Schutz. Nach dem Ernten wurde die Kresse zwischen Löschpapier getrocknet, gepresst und iodiert (III-5.2.1 Iodierung von Kresseblättern) bevor sie auf Klebeband für die LA-ICP-MS fixiert wurde.

Frische Kresse

Bei dieser Kresse war der Aufbau der Kultivierung der gleiche wie bei der obigen Kresse aber mit dem Unterschied, dass diese in frischem Zustand iodiert und gemessen wurde. Optimiert wurden allerdings die Zeiträume der gadoliniumfreien Kultivierung (5 d) und der Exposition (3 d) bei 10 mg Gd l⁻¹ Gd-DTPA-Lösung.

5.1.5 Untersuchung der Verteilung von essentiellen Elementen

Die Kresse wurde sieben Tage lang auf Sand kultiviert, der mit 10 mg Gd aus Gd-DTPA kg⁻¹ Sand versetzt war. Nach dem Ernten wurden die Wurzeln gewaschen und die Kresse zwischen Löschpapier getrocknet, gepresst und auf Klebeband für die LA-ICP-MS fixiert.

5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, μ -SRXRF & LA-ICP-MS

Da es bezüglich der Bestimmung von Gadolinium in Kresse mittels SRXRF Einschränkungen wegen möglicher Interferenzen von Mangan und Eisen gibt, wurde ein zweites Zentralion mit dem gleichen Chelat eingeführt. Dafür wurde Praseodym gewählt, weil es interferenzfrei mit der SRXRF in Kresse untersucht werden kann und auch für Vorunter-

suchungen mittels LA-ICP-MS genutzt werden kann. Als Reinelement ist ^{141}Pr besonders empfindlich nachweisbar.

Die Kresse wurde zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit der Kultivierung in einem löchrigen Plastikschälchen auf Polystyrolgranulat kultiviert. Nachdem die Pflanzen deutliche Blätter und Wurzeln ausgebildet hatten (etwa 2 cm Größe), wurden sie für jeweils 2×2 h pro Tag – insgesamt 7×2 h – in eine Lösung bestehend aus je 100 mg Gd l^{-1} (Gd-DOTA) und 100 mg Pr l^{-1} (Pr-DOTA) gestellt. Nach jeder Exposition wurden die Wurzeln und das Granulat durch fünfmaliges Tränken in Leitungswasser gewaschen. Da die gesamte Expositionsdauer dadurch relativ kurz war (14 h) wurde hier die Konzentration des Kontrastmittels erhöht. Die Pr-DOTA-Lösung wurde aus $79.69 \text{ mg } (\triangleq 0.18 \text{ mmol}) \text{ Pr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ und $75.65 \text{ mg } (\triangleq 0.18 \text{ mmol})$ DOTA in 100 ml hergestellt und anschließend verdünnt.

Der Großteil der Kresse wurde aufgeschlossen und mittels ICP-MS hinsichtlich der Gehalte von Praseodym und Gadolinium untersucht.

Zwei Blätter derselben Charge wurden zwischen Löschpapier getrocknet und gepresst. Ein Kresseblatt davon wurde mittels LA-ICP-MS hinsichtlich der Praseodymverteilung untersucht (IV-4.4 Verteilung von Pr), während das andere Blatt zuerst mittels SRXRF und anschließend mittels LA-ICP-MS gemessen wurde. Zuvor wurde die Blattdicke an sieben Stellen mit dem digitalen Messtaster MT12 (Heidenhain, Schaumburg Township, IL, USA) gemessen. Die durchschnittliche Blattdicke beträgt $46 \pm 3 \mu\text{m}$. Die Masse des Blattes wurde mit 0.47 mg ermittelt. Die Grundfläche des Blattes wurde mithilfe des Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, Kalifornien, USA) anhand eines Photos des Blattes auf Millimeterpapier bestimmt. Durch den direkten Vergleich einer Fläche des Millimeterpapiers mit der Fläche des Blattes wurde mit der Software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, Kalifornien, USA) die Grundfläche des Blattes mit 7.9 mm^2 bestimmt. Die durchschnittliche Dichte wurde durch den Quotient aus Masse und Volumen (Grundfläche \times Dicke) mit 1.29 g cm^{-3} berechnet.

5.2 Standard zum Ausgleich von Variationen des Messsignals

5.2.1 Iodierung von Kresseblättern

Zunächst wurde aus 83 mg KI in 10 ml deionisiertem Wasser ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) eine 50 mM KI -Lösung hergestellt. Um aus dieser eine KI_3 -Lösung herzustellen, wurde zu der KI-

Lösung unter Rühren I_2 bis zur Sättigung gegeben. Kurz vor der Iodierung wurden 87 mg $Na_2S_2O_4$ in 10 ml deionisiertem Wasser gelöst.

Die Kresseblätter der getrockneten und frischen Kresse (III-5.1.4 Überprüfung von Iod als internen Standard) wurden mit KI_3 -Lösung betropft, so dass sie vollständig davon umgeben waren. Dies gestaltete sich schwierig, da die Blätter hydrophob waren und dadurch Auftrieb in der Lösung hatten. Nach 3 min bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe der $Na_2S_2O_4$ -Lösung - bis sich die Iodlösung entfärbte - gestoppt. Die Mischung wurde nach 10 min bei RT vorsichtig mit einem Baumwolltuch abgesaugt und die Blätter mehrfach mit deionisiertem Wasser gewaschen. Nachdem auch das Wasser abgesaugt wurde, konnten die Kresseblätter auf Klebeband für die LA-ICP-MS fixiert werden.

5.2.2 Barium

Zur Normierung des ^{158}Gd -Signals auf das ^{137}Ba -Signal wurde je eine Linie auf einem Glasobjektträger (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) zu Beginn und dann nach jeder 25sten Linie auf den Proben mit den gleichen Parametern aber einem größeren Abstand ($350\text{ }\mu\text{m}$) der Linien ablatiert. Diese Normierung wurde für die LA-ICP-MS-Messung des einzelnen Kresseblattes zur Quantifizierung von Gadolinium (III-5.5 Quantifizierung von Gd und Pr in Kresse, Ergebnisse siehe IV-4.5.3 Barium & IV-4.6.2.1 Quantifizierung von Gd und Pr im Kresseblatt mittels LA-ICP-MS) durchgeführt.

5.3 Mikrowellenaufschlüsse von Kresse

Für den Aufschluss wurden 10-50 mg der getrockneten Proben in eine Mischung aus 4 ml Salpetersäure (67 %, p. a.) und 2 ml Wasserstoffperoxid (30 %, suprapur) in Quarzgefäße gegeben. Der Aufschluss in der Hochdruck-Temperatur-Mikrowelle (UltraClave III, MLS GmbH, Leutkirch, Deutschland) erfolgte nach dem in Tabelle 10 dargestellten Druck- und Temperaturverlauf. Die Leidlösung in der Mikrowelle bestand aus 320 ml Wasser, 30 ml Wasserstoffperoxid, 2 ml Schwefelsäure. Der Vordruck war auf 50 bar eingestellt. Die Leistung betrug 1000 W.

Tabelle 10: Temperatur- und Druckverlauf während des Mikrowellenaufschlusses

Zeitintervall	Temperatur	Druck
0 - 20 min	RT* – 80 °C	160 bar
20 - 30 min	80 °C	160 bar
30 - 40 min	80 – 150 °C	160 bar
40 - 50 min	150 °C	160 bar
50 - 70 min	150 – 250 °C	170 bar
70-115 min	250 °C	170 bar
115-235 min	250 °C - RT	1 bar

*RT: Raumtemperatur

Die Gd-Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels ICP-MS mit einem Flüssigprobeneintragssystem, so dass die Gd-Gehalte in der Kresse berechnet werden konnten.

5.4 Reproduzierbarkeit von Tropfen unter Matrixeinfluss

Fünf unbehandelte auf Klebeband fixierte Kresseblätter wurden mit je einem 1 µl Tropfen mit einer Konzentration von 1 mg Gd l⁻¹ (Gd-DOTA) und 1 mg Pr l⁻¹ (Pr-DOTA) betropft und mittels LA-ICP-MS hinsichtlich der Reproduzierbarkeit des Verfahrens über jeden Tropfen untersucht.

5.5 Quantifizierung von Gd und Pr in Kresse

Die untersuchte Kultivierung der Kresse fand wie unter III-5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, µ-SRXRF & LA-ICP-MS beschrieben statt.

5.5.1 ICP-MS

Für den Hochdruck-Hochtemperatur-Mikrowellenaufschluss wurden neun Replikate mit je 150 Blättern à ≈ 50 mg Feuchtmasse geerntet und im Trockenschrank getrocknet. Vor dem Mikrowellenaufschluss wurden die in H₂O₂ und HNO₃ gelösten Blätter mit 60 µl einer 100 mg l⁻¹ Eu-Lösung als internem Standard versetzt. Der Aufschluss erfolgte wie in „III-5.3 Mikrowellenaufschlüsse von Kresse“ beschrieben. Die Aufschlusslösungen wurden in jeweils 4200-facher Verdünnung mit einem HNO₃-Anteil von 1 Vol.-% gemessen, wobei die Säure als 65 %ige Säure vorlag.

Zur Kalibrierung wurde eine Standardaddition auf einer der verdünnten Aufschlüssen der Blätter durchgeführt. Es wurden sechs Konzentrationen von Gd aus Gd-DTPA-BMA (Omniscan®) sowie die gleichen Konzentrationen von Pr aus Pr-DOTA zu einer Aufschlüssenlösung addiert ($0.01 \mu\text{g Pr l}^{-1}$, $0.05 \mu\text{g Pr l}^{-1}$, $0.1 \mu\text{g Pr l}^{-1}$, $0.5 \mu\text{g Pr l}^{-1}$, $1 \mu\text{g Pr l}^{-1}$, $5 \mu\text{g Pr l}^{-1}$). Gemessen wurden die Lösungen am Quadrupol-Massenspektrometer iCAP Q.

5.5.2 SRXRF

Zunächst wurde mit einem Reinstelementstandard die Zählrate für reines Gadolinium bestimmt, mit Hilfe derer dann ein Faktor für den Zusammenhang zwischen gemessenen Gd-Counts und enthaltener Gd-Flächenbedeckung berechnet werden kann. Das Gd-Blech (0.25 mm , 99.9% , $25 \times 25 \text{ mm}$ Größe, unter Argon-Schutzatmosphäre, Goodfellow, Bad Nauheim, Deutschland) wurde dafür aus der Originalverpackung mit Schutzatmosphäre genommen und zum Schutz vor Korrosion mit Klebeband abgeklebt.

Die Röntgenfluoreszenz des Kresseblattes wurde anschließend mit einer eingestrahlten Energie von 9.9 keV gemessen. Mit einer Spotgröße von $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ wurden 158×69 Punkte mit einer Messzeit von je 15 s pro Messpunkt gescannt. Die Kressepflanze wurde mit Klebeband so befestigt, dass das zu messende Kresseblatt frei in der Luft war und so die Messung nicht von einem Probenträger beeinflusst wurde.

Wegen der Interferenz von Mangan ($K\alpha$ bei 5.9 keV) in der Kresse mit der Gd- $L\alpha$ -Linie (6.0 keV), wurde die Gd- $L\beta$ -Linie bei 6.7 keV für die Untersuchungen herangezogen. Da auch die $K\alpha$ -Linie von Eisen bei 6.4 keV nah bei beiden Linien des Gadoliniums liegt, wurde dem Nährmedium zusätzlich zum Gd-DOTA das Pr-DOTA zugesetzt, um bei möglichen Interferenzen auf die interferenzärmeren $L\alpha$ - und $L\beta$ -Linie des Praseodyms ausweichen zu können. Dabei wurde zunächst getestet, ob sich Gd-DOTA und Pr-DOTA ähnlich verhalten.

Zur Berechnung der Gehalte von Praseodym und Gadolinium wurde über alle Spektren des Kresseblattes integriert.

5.5.3 LA-ICP-MS

Für die Berechnung der aufgenommenen Gd-Mengen wurde eine externe matrixangepasste Kalibrierung des Kresseblattes mittels LA-ICP-MS durchgeführt. Dafür wurden die

Mittelwerte der Gd-Konzentrationen aus der gleichen Kressecharge, die mit der ICP-MS mit Flüssigprobeneintragssystem ermittelt wurden, zugrunde gelegt. Als Charge wird dabei die Gesamtheit aller zur gleichen Zeit und am gleichen Ort unter gleichen Bedingungen kultivierten Kressepflanzen gezählt. Auf 15 unbelastete Kresseblätter wurde je 1 µl in fünf verschiedenen Konzentrationen (3.13 mg Gd l⁻¹, 6.25 mg Gd l⁻¹, 12.5 mg Gd l⁻¹, 25 mg Gd l⁻¹, 50 mg Gd l⁻¹) aus Gd-DTPA-BMA (Omniscan®) in drei Replikaten aufgetropft. Zunächst wurden fünf unbelastete Blindwertblätter ohne Tropfen gemessen. Die fünf Tropfen einer Reihe wurden in einem Block ablatiert, gefolgt von der zweiten und dritten Reihe (Abbildung 18).

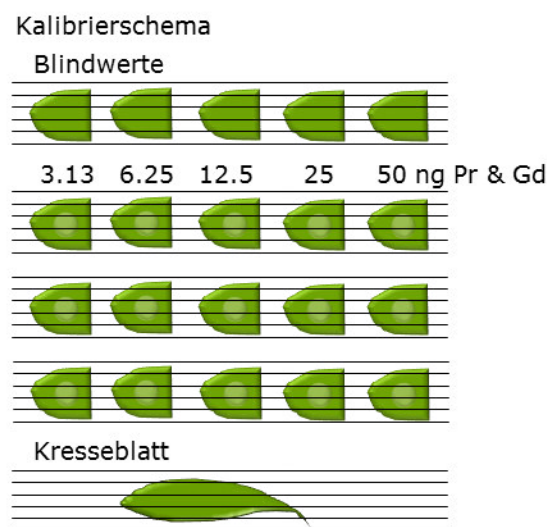


Abbildung 18: Schema der Ablation der Blindwertkresseblätter, der Kalibrierreihen und des Kresseblattes zur Quantifizierung von Pr und Gd in einem exponierten Kresseblatt

Das ¹⁵⁸Gd-Signal wurde auf das ¹³⁷Ba-Signal im Glasobjektträger normiert (siehe III-5.2.2 Barium). Als Scangeschwindigkeit wurden bei diesem Versuch 30 µm s⁻¹ statt der sonst verwendeten 50 µm s⁻¹ gewählt, um die Auflösung zu erhöhen, wobei die Vergleichbarkeit zu den anderen Experimenten keine große Rolle gespielt hat.

6. Aquatische Fauna – Wasserflöhe (*Daphnia magna*)

6.1 Nährmedium für Wasserflöhe

Die Wasserflöhe wurden im Elendt M4-Medium nach OECD Guideline 211^[195] gezüchtet. Zur Herstellung des Mediums wurden die Chemikalien wie in Tabelle 11 beschrieben eingewogen und auf unterschiedliche Volumina für die Stammlösungen I-VII.2 aufgefüllt. Das Nährmedium setzt sich zusammen aus je 1 ml aus Stammlösung I, III, IV.1, VI, 20 ml von

Stammlösung II, 5 ml von Stammlösung IV.2, 2 ml aus Stammlösung V und 5 ml aus Stammlösung VII.2, die zusammen auf 2000 ml aufgefüllt wurden.

Tabelle 11: Einwaagen für das Elendt M4-Medium

Stammlösung	Verbindung	Einwaagen [g]	Nährmedium
I	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.500	1 ml Stammlösung I auf 2000 ml Nährmedium
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.199	
		auf 100 ml	
II	CaCl ₂ ·2H ₂ O	5.879	20 ml Stammlösung II auf 2000 ml Nährmedium
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.468	
	KCl	0.117	
	NaHCO ₃	1.296	
		auf 200 ml	
III Kationen	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.721	1 ml Stammlösung III auf 2000 ml Nährmedium
	LiCl	0.613	
	RbSO ₄	0.157	
	SrCl ₂ ·6H ₂ O	0.305	
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.033	
	ZnSO ₄	0.026	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.021	
IV.1 Anionen		auf 1000 ml	1 ml Stammlösung IV.1 auf 2000 ml Nährmedium
	KI	0.0065	
	Na ₂ SeO ₃	0.0044	
	NH ₄ VO ₃	0.0012	
	NaBr	0.0320	
IV.2 Anionen	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.1260	5 ml Stammlösung IV.2 auf 2000 ml Nährmedium
		auf 1000 ml	
V Phosphate	H ₃ BO ₃	5.722	2 ml Stammlösung V auf 2000 ml Nährmedium
	NaNO ₃	27.409	
		auf 100 ml	
	KH ₂ PO ₄	0.014	
	K ₂ HPO ₄	0.020	
		auf 100 ml	

VI Silikat	Na ₂ SiO ₃	1.000	
		auf 500 ml	1 ml Stammlösung VI auf 2000 ml Nährmedium
VII.1 Vitamine	B12	0.0101	
	Biotin	0.0077	
		auf 200 ml	
VII.2 Vitamine	VII.1	2 ml	
	Thiamine (HCl)	0.0074	
		auf 100 ml	4 ml Stammlösung VII.2 auf 2000 ml Nährmedium

6.2 Aufnahme eines Kontrastmittels aus dem umgebenden Medium

Daphnie 1 wurde für 19 h in einem mit Gd-DTPA (Magnevist®, Gadolinium(III)-2-[Bis[2-bis(carboxymethyl)amino]ethyl]amino]essigsäure) versetzten Elendt M4-Medium mit 100 mg Gd l⁻¹ exponiert. Die Konzentration wurde so hoch gewählt, um die Methode mit der LA-ICP-MS entwickeln zu können, ohne an die Nachweisgrenzen zu stoßen. Die Daphnie wurde nach der Entnahme für zwei Minuten in deionisiertem Wasser gewaschen, um unspezifisch gebundenes Kontrastmittel zu entfernen und anschließend an der Luft getrocknet.

Zur Vorbereitung auf die μ -CT wurde Daphnie 1 mit Sekundenkleber auf den Proben-träger geklebt. Dieser bestand aus einem Plastikzylinder, auf dessen oberer Grundfläche die Probe fixiert wurde. Das untere Ende wurde über ein inneres Gewinde auf einen Drehtisch geschraubt.

Während der Messung wurde die Probe in 1200 Winkeln um 360° gedreht und bei jedem Winkel 4.5 s lang die Absorption gemessen. Zur Beobachtung des Untergrundes wurden im Abstand von 100 Winkeln je 10 Messungen von der umgebenden Luft gemacht (Flatfiles), die dann anschließend vom Spektrum der Daphnie abgezogen wurden. Zum Vergleich wurde eine ähnlich große unbelastete Daphnie gemessen (900 Winkel; 3.7 s/Spektrum).

In dieser Arbeit wurden je zwei ausgewählte Ansichten der beiden Daphnien zweidi-mensional dargestellt. Beide Ansichten wurden wiederum mit je zwei Grauwertspreizun-gen dargestellt. Die Grauwertspreizungen haben einen oberen und einen unteren dimen-sionslosen Wert. Die unteren Grauwertspreizungswerte liegen in allen Fällen bei 10. Die oberen Werte sind in der jeweiligen Abbildung angegeben. Die angegebenen Werte ent-

sprechen verschiedenen Kontrasten, wobei ein höherer (oberer) Wert hier einen höheren Kontrast darstellt.

Die exponierte Daphnie (Daphnie 1) wurde anschließend mittels LA-ICP-MS untersucht. Dafür musste die Daphnie auf einen anderen Probenträger umgelagert werden. Da sie mit Sekundenkleber befestigt war, wurde sie vorsichtig von diesem herunter geschnitten. Für die anstehende Messung mittels LA-ICP-MS wurde die Daphnie auf Klebeband fixiert.

6.3 Aufnahme eines Kontrastmittels über die Nahrung

Einzellige Schwebalgen (*Scenedesmus subspicatus*) wurden in einem mit 50 mg Gd l⁻¹ mit Gd-DTPA versetztem WC-Medium gezüchtet und dabei in einer Gaswaschflasche permanent mit Luft versorgt. Für 16 h pro Tag war eine Tageslichtlampe eingeschaltet.

Durch das stetige Algenwachstum war es nötig, die Algenzuchtlösung zu verdünnen, so dass bei Verwendung der Algen als Futter ein Gehalt von etwa 28 mg Gd l⁻¹ in der Algen-Lösung enthalten war. Dieser Gehalt wurde aus der zugegebenen Menge an Gd-DTPA und der – während der Zucht – verdunsteten bzw. zugegebenen (Nähr-)Lösung berechnet. Die Algen wurden mehrfach filtriert und gewaschen und ein Teil davon in einer Portion zur Daphnie gegeben. Nach 19 h wurde die Daphnie aus der Lösung entnommen, getrocknet und für die Laserablation auf Klebeband fixiert.

IV ERGEBNISSE & DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Aufnahme von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln in Modellorganismen zu untersuchen und die Verteilung von Gadolinium in Modellorganismen mit verschiedenen bildgebenden Verfahren – insbesondere mit der Laserablation-ICP-MS (LA-ICP-MS) – darzustellen. Außerdem soll für die LA-ICP-MS ein Standard zum Ausgleich von Variationen während der Messungen gefunden und genutzt, sowie ein Quantifizierungskonzept für Gadolinium in einem Modellorganismus entwickelt und verifiziert werden. Als Kontrastmittel zur Exposition der individuellen biologischen Systeme dienen Gd-DTPA (Magnevist®), Gd-DTPA-BMA (Omniscan®) und Gd-DOTA (Dotarem®). Anhand verschiedener Modellorganismen aus den Bereichen der Wasser- (Fadenalge), Schwimm- (Wasserlinse) und Landpflanzen (Kresse) sowie der aquatischen Fauna (Wasserfloh) wird im Folgenden untersucht, ob gadoliniumbasierte Kontrastmittel von Pflanzen und Tieren aufgenommen werden, inwiefern die Aufnahme von der Dauer der Exposition und der Konzentration des Kontrastmittels in der Nährlösung abhängt und wie sich das Gadolinium verteilt. Die dabei verwendeten Gd Konzentrationen sind sehr hoch im Vergleich zu denen in der Natur, wurden aber dennoch gewählt, um eine ausreichend hohe Aufnahme nach einer kurzen Expositionszeit zu erzeugen und um ausreichend intensive Signale für die Entwicklung des Quantifizierungskonzeptes zu generieren.

Diese Untersuchungen werden mittels LA-ICP-MS, Röntgenfluoreszenzanalyse mit Synchrotronstrahlung (SRXRF), ICP-MS nach Aufschluss und dreidimensionaler μ -Computertomographie (3D μ -CT) durchgeführt. Hinsichtlich ihrer Eignung als interner Standard für Kresse werden essentielle und von außen eingebrachte Elemente überprüft. Schließlich wird ein Quantifizierungskonzept für Gadolinium in einem Kresseblatt mittels LA-ICP-MS vorgestellt, das mit der SRXRF und ICP-MS nach Aufschluss verifiziert wird.

Zunächst sollen die Nachweisgrenzen der LA-ICP-MS und der SRXRF unter individuell optimierten Bedingungen ermittelt und verglichen werden. Anschließend werden die Modellorganismen nacheinander in der Reihenfolge mit aufsteigender biologischer Komplexität untersucht.

1. Nachweisgrenzen

Um die Nachweisgrenzen der beiden genutzten Methoden LA-ICP-MS und SRXRF miteinander vergleichen zu können, wurden unter jeweils optimierten Bedingungen eingetrocknete Multielementstandardtropfen untersucht.

1.1 Nachweisgrenzenbestimmung mittels LA-ICP-MS

Es wurden 1 μl -Tropfen mit sieben Gehalten mit den folgenden Elementen auf einen Adhäsionsobjektträger getropft: Magnesium, Calcium, Mangan, Eisen, Kupfer, Cadmium, Praseodym und Gadolinium. Nach deren Eintrocknen wurden sie mittels Laser in Linien-scans ablatiert und im ICP-MS analysiert (siehe III-2. Nachweisgrenzen mittels aufgetropfter Standards).

In Abbildung 19 ist beispielhaft die Intensitätsverteilung von ^{158}Gd in den Tropfen dargestellt. Eine ähnliche Verteilung zeigte sich auch bei den anderen gemessenen Isotopen (^{25}Mg , ^{44}Ca , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{114}Cd und ^{141}Pr). Die weißen Bereiche bei den höchstkonzentrierten Tropfen stellen Intensitäten oberhalb der Skala dar, die wegen der Vergleichbarkeit der verschiedenen Tropfen nicht dynamisch angelegt wurde.

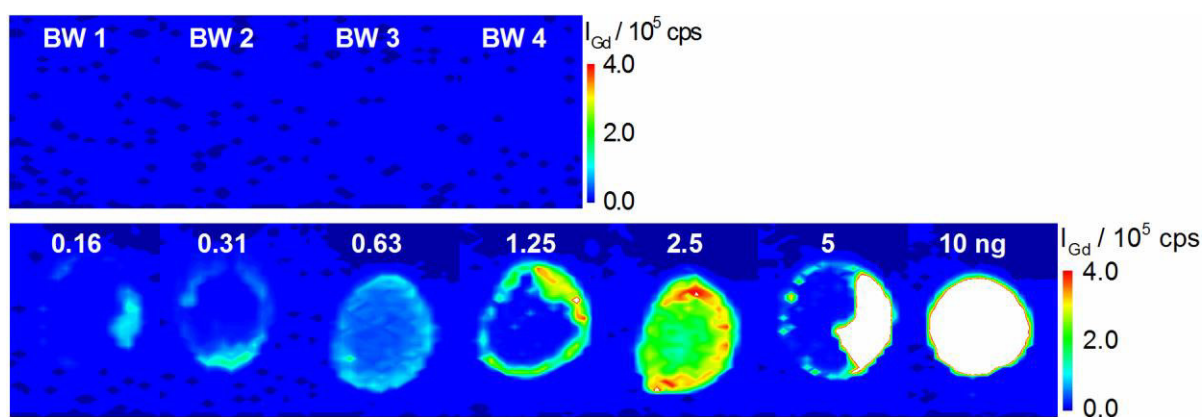


Abbildung 19: Intensitätsverteilungen von elf eingetrockneten 1 μl Multielementstandardtropfen von ^{158}Gd in Absolutmengen von 0.16 ng, 0.31 ng, 0.63 ng, 1.25 ng, 2.5 ng, 5 ng, 10 ng und vier Blindwerten; Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 4.3 J cm^{-2} , Laserspotgröße $50 \mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit $20 \mu\text{m s}^{-1}$, Wiederholrate 20 Hz, ablatierte Fläche pro Tropfen $0.8 \times 1.0 \text{ mm}^2$

Bei der gewählten Laserspotgröße von $50 \mu\text{m}$ sind deutlich die inhomogene Verteilung und der Kaffeeringeffekt des Gadoliniums in den eingetrockneten Tropfen zu erkennen. Der Kaffeeringeffekt kann folgendermaßen erklärt werden^[196]: Die Ränder des Tropfens sind mit der unebenen Oberfläche des Untergrundes „verankert“, wodurch das Wasser beim Verdunsten nicht an Umfang, sondern an Höhe verliert. Da am Rand des Tropfens

die Verdunstungsfläche am größten ist, entstehen im Inneren des Tropfens Strömungen, die die enthaltenen Partikel, die nach dem Erreichen des Löslichkeitsproduktes entstehen, nach außen transportieren.

Wie demnach erwartet, ist die Verteilung der Intensitäten von ^{158}Gd nicht gleichmäßig innerhalb der einzelnen Tropfen. An den Rändern sind die Intensitäten von ^{158}Gd durch die gebildeten Agglomerate der Salze deutlich höher im Vergleich zur Mitte der Tropfen. Beim Tropfen mit einer Absolutmenge von 5 ng Gd wird dies besonders deutlich. Hier ist fast die gesamte Intensität auf einen Bereich am Rand konzentriert. Vom restlichen Tropfen ist nur die schwache Umrandung erkennbar.

Bei einer homogenen Verteilung der Elemente im Tropfen, würde eine stichprobenartige Untersuchung der eingetrockneten Tropfenoberfläche ausreichen. Der Kaffeeringeffekt hat jedoch zur Folge, dass die Intensitäten des gesamten Tropfens in die Berechnung der Nachweisgrenzen einbezogen werden müssen. Dafür wurden die Integrale der Intensitäten der untersuchten Isotope für jede Absolutmenge über den gesamten Bereich nach Abzug der Basislinie gebildet. Abbildung 20 zeigt die erhaltenen Kalibrierfunktionen für ^{25}Mg , ^{44}Ca , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{114}Cd , ^{141}Pr und ^{158}Gd in Abhängigkeit der aufgetropften Gesamtmenge des jeweiligen Isotops. Diese wurden mit Hilfe der Integrale der gemessenen Intensitäten der sieben auf den Adhäsionsobjektträger getropften Multielementtropfen mit den Absolutmengen zwischen 0.16 und 10 ng sowie der Mittelwert der Integrale der vier Blindwerte mit deren Standardabweichungen berechnet. Die Kalibriergraphen zeigen für alle gemessenen Isotope eine gute Linearität.

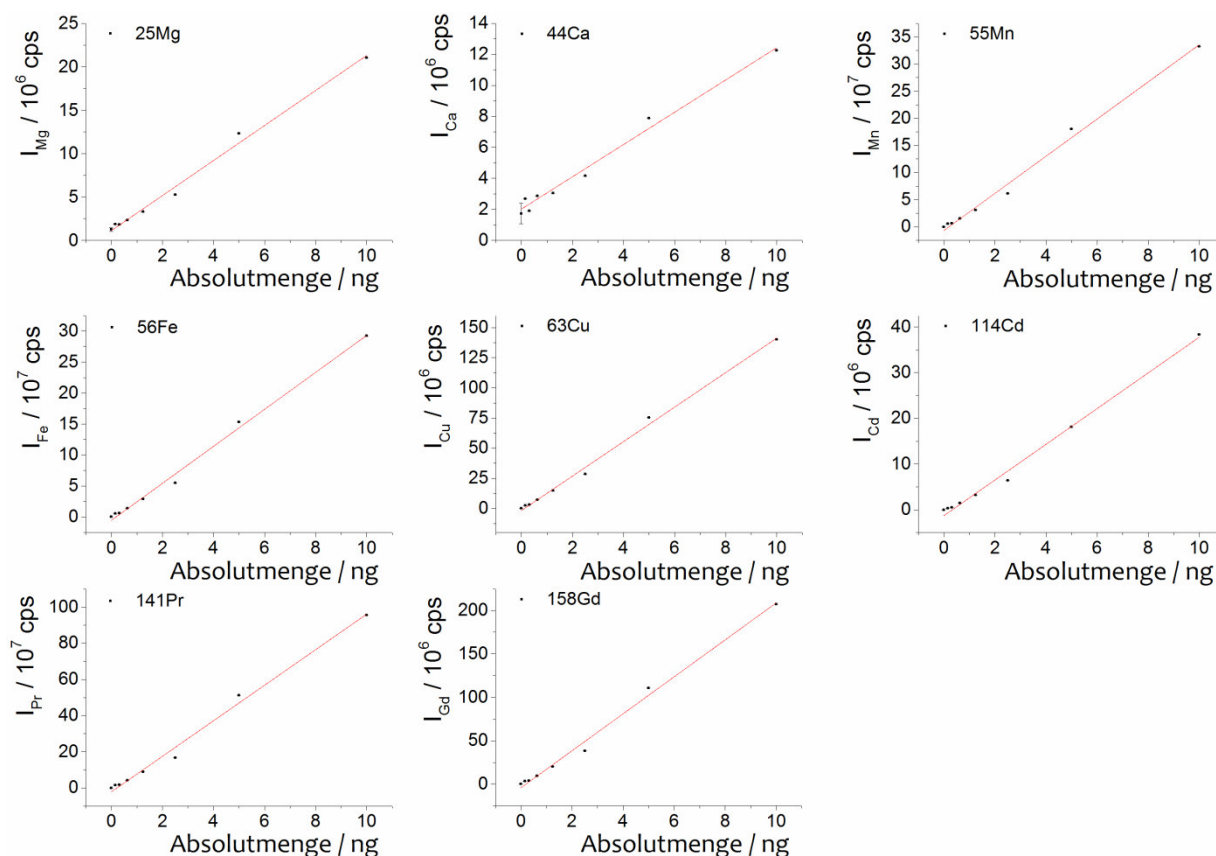


Abbildung 20: Kalibriergraphen der eingetrockneten 1 µl Multielementstandardtropfen der Isotope ^{25}Mg , ^{44}Ca , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{114}Cd , ^{141}Pr und ^{158}Gd in den Absolutmengen 0.16 ng, 0.31 ng, 0.63 ng, 1.25 ng, 2.5 ng, 5 ng, 10 ng gemessen mit LA-ICP-MS; Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 4.3 J cm^{-2} , Laserspotgröße 50 µm, Scangeschwindigkeit 20 µm s^{-1} , Wiederholrate 20 Hz, ablatierte Fläche pro Tropfen $0.8 \times 1.0 \text{ mm}^2$

Die sich aus den berechneten Kalibriergraphen ergebenden Bestimmtheitsmaße, Steigungen, sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der zugehörigen Isotope sind in Tabelle 12 gezeigt.

Tabelle 12: Bestimmtheitsmaße, Steigungen, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der eingetrockneten Multielementstandardtropfen auf einem Adhäsionsglasobjektträger; Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 4.3 J cm^{-2} , Laserspotgröße 50 µm, Scangeschwindigkeit 20 µm s^{-1} , Wiederholrate 20 Hz, ablatierte Fläche pro Tropfen $0.8 \times 1.0 \text{ mm}^2$

	^{25}Mg	^{44}Ca	^{55}Mn	^{56}Fe	^{63}Cu	^{114}Cd	^{141}Pr	^{158}Gd
Bestimmtheitsmaß R^2	0.993	0.986	0.993	0.995	0.996	0.994	0.993	0.994
Steigung $m \text{ [cps ng}^{-1}\text{]}$	$8.1 \cdot 10^4$	$4.2 \cdot 10^4$	$1.4 \cdot 10^6$	$1.2 \cdot 10^6$	$5.7 \cdot 10^5$	$1.5 \cdot 10^5$	$3.9 \cdot 10^6$	$8.5 \cdot 10^5$
NG [pg]	320	810	0.66	15	9.6	0.21	0.11	0.78
BG [pg]	940	2500	2.0	44	29	0.61	0.32	2.4

Für ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{114}Cd , ^{141}Pr und ^{158}Gd liegen die Bestimmtheitsmaße R^2 bei über 0.99 (Tabelle 12). Daraus kann eine gute Reproduzierbarkeit der Methode für die gemessenen Isotope im Mengenbereich zwischen 0.16 ng und 10 ng geschlussfolgert werden. Die geringere Übereinstimmung der Ausgleichsgeraden mit den Kalibrierpunkten bei ^{44}Ca kann durch die höhere Bestimmungsgrenze erklärt werden. Da diese bei 2.5 ng liegt, können die geringer konzentrierten eingetrockneten Tropfen nicht reproduzierbar bestimmt werden.

Die Nachweisgrenzen wurden für eingetrocknete „matrixfreie“ Multielementstandardtropfen mittels LA-ICP-MS ermittelt und liegen zwischen 110 fg für ^{141}Pr und 810 pg für ^{44}Ca . Diese gelten ausschließlich für die hier verwendeten Parameter (siehe Bildunterschrift von Abbildung 20 und III-2.1 Nachweisgrenzen mittels LA-ICP-MS). Wegen der fehlenden Informationen zum Matrixeinfluss und den Nachweisgrenzen bezüglich eines Laserschusses sind die Nachweisgrenzen zwar nicht auf Realproben anwendbar, liefern aber wichtige Kenngrößen der Methode und dienen dem Vergleich der beiden verwendeten Methoden LA-ICP-MS und SRXRF.

1.2 Nachweisgrenzenbestimmung mittels SRXRF

Für die Untersuchung der Nachweisgrenzen mittels SRXRF wurden die Analyten wegen möglicher Interferenzen auf sechs verschiedene Lösungen aufgeteilt (1: Cu, Fe, Yb; 2: Zn, I, Gd; 3: Ca, La, Tb; 4: Pr, Er, Yb; 5: Cu, I, Eu; 6: La, Ho, Tm). Je 1 μl der 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ -Lösungen wurde eingetrocknet und mit einem ausreichend großen Strahl der gesamte Tropfen (siehe III-5.5 Quantifizierung von Gd und Pr in Kresse) gemessen. Als untergrundärmster (wenig Zn & Fe) Probenträger hat sich dabei Klebeband (Tesafilem®) erwiesen. Die Spektren der gemessenen eingetrockneten Tropfen, sowie von Luft und Klebeband sind in Abbildung 21 dargestellt. In jedem Spektrum wird bei der Anregungsenergie (10 keV) ein Streupeak erzeugt. Dieser entsteht durch die Richtungs- und Energieänderungen der Röntgenstrahlen an Materie und ist am Rand der Spektren zum Teil erkennbar. Die Fluoreszenzlinien der Elemente erscheinen bei den jeweils tabellierten Energiewerten.

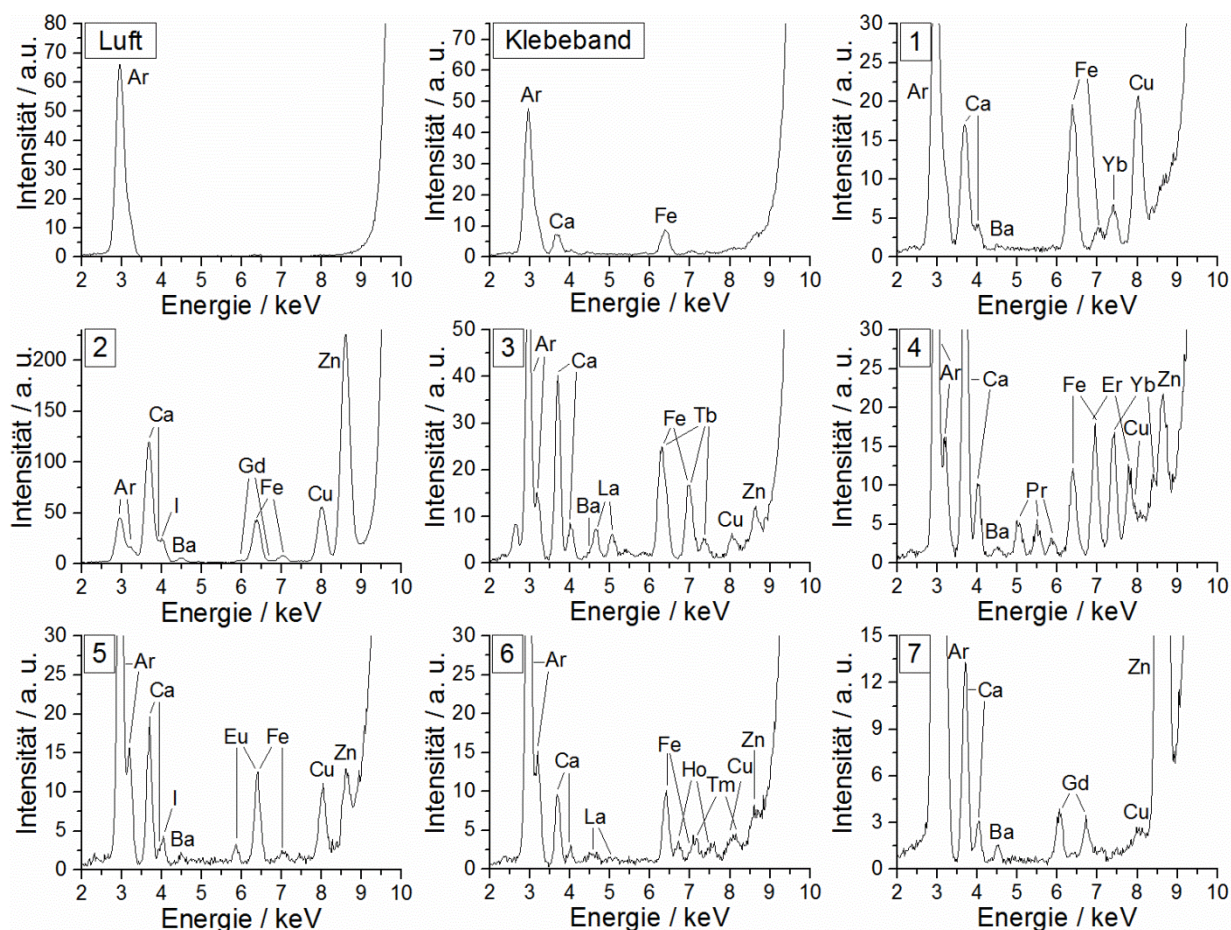


Abbildung 21: Mittels SRXRF gemessene normierte Spektren der sieben eingetrockneten Tropfen, Luft und Tesafilm; Die nummerierten Abbildungen enthalten die folgenden Elemente: **1:** Cu, Fe, Yb; **2:** Zn, I, Gd; **3:** Ca, La, Tb; **4:** Pr, Er, Yb; **5:** Cu, I, Eu; **6:** La, Ho, Tm; **7:** Gd. Messparameter: Strahlenergie 10 keV, Spotgröße $1.0 \times 1.4 \text{ mm}^2$ (Reihe 1-3, Luft, Klebeband), $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ (Reihe 4-6), $0.33 \times 0.25 \text{ mm}^2$ (Reihe 7), Messzeit 120 s

Für die Berechnung wurde jeweils die intensivste, störungsfreie Linie der einzelnen Elemente im gemessenen spektralen Bereich gewählt und integriert. Die Berechnung der Nachweisgrenzen erfolgte mit dem statistischen Ansatz mit der in „II-2.2.2 Synchrotronstrahlung“ gezeigten Formel und ist auf 1000 s Messzeit normiert. In Tabelle 13 sind die ermittelten Nachweisgrenzen tabelliert.

Tabelle 13: Mittels SRXRF ermittelte Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen ($BG = 3 \cdot NG$) von je 1 μl eingetrockneten Multielementstandardtropfen auf Klebeband normiert auf 1000 s Messzeit; Messparameter: Strahlenergie 10 keV, Spotgröße $1.0 \times 1.4 \text{ mm}^2$ (Reihe 1 – 3 Luft, Klebeband), $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ (Reihe 4 – 6), $0.33 \times 0.25 \text{ mm}^2$ (Reihe 7), Messzeit 120 s

Element	NG [pg]	BG [pg]	NG [Anzahl der Atome $\cdot 10^{11}$]
La	61	190	2.6
Pr	79	240	3.4
Eu	142	430	5.6
Gd	89	267	3.4
Ho	179	540	6.5
Er	41	130	1.5
Yb	43	130	1.5

Die Nachweisgrenzen gelten ausschließlich für die verwendeten Parameter. Sie liegen im Bereich zwischen 41 pg für Erbium und 179 pg für Holmium.

Einige Elemente sind aufgrund verschiedener Ursachen nicht analysierbar. Calcium, Eisen, Kupfer und Zink beispielsweise haben einen hohen, stark schwankenden Untergrund, der durch das Klebeband oder durch Kontaminationen bei der Probenvorbereitung verursacht wird. Iod bildet nicht abtrennbare Interferenzen mit Calcium. Terbium interferiert mit Eisen, und Thulium sowohl mit Eisen als auch mit Kupfer.

Obwohl für einige Elemente ähnliche Nachweisgrenzen erwartet wurden sind diese aus mehreren Gründen unterschiedlich:

1. Die Mengenangaben beziehen sich auf die jeweiligen Elementmassen. Üblicher ist es daher die Anzahl der Atome jedes Elementes zu nennen, die zur Zahl der Ereignisse beitragen (siehe Tabelle 13). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden wegen der besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der LA-ICP-MS-Messungen in Absolutmengen angegeben.
2. Die Strahlenergie war auf 10 keV festgelegt. Damit war die Anregungswahrscheinlichkeit der einzelnen Elektronenübergänge der Elemente unterschiedlich groß, denn je näher der Elektronenübergang (spezifische Kante) energetisch an der Strahlenergie liegt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Anregung. So lässt sich beispielsweise Gadolinium ($L\alpha$ 6.0; $L\beta_1$ 6.7) nicht so gut anregen wie Ytterbium ($L\alpha$ 7.4; $L\beta_1$ 8.4).

3. Weitere Unterschiede zu den erwarteten Nachweisgrenzen ergeben sich durch Interferenzen, durch die Auswertung einer oder mehrerer Linien und den unterschiedlich hohen Untergrund verursacht durch die Nähe zum Streupeak oder zu anderen intensiven Elementsignalen in unmittelbarer Umgebung.

Im Vergleich der Nachweisgrenzen der mit beiden Methoden LA-ICP-MS und SRXRF gemessenen Elemente (Tabelle 14) zeigt sich, dass die LA-ICP-MS unter den verwendeten Bedingungen die um etwa zwei bis drei Größenordnungen nachweisstärkere Methode für die beiden Lanthanide Praseodym und Gadolinium ist.

Tabelle 14: Vergleich der mit beiden Methoden (LA-ICP-MS und SRXRF) ermittelten Nachweisgrenzen, bestimmt mit Hilfe eingetrockneter Multielementstandardtropfen (III-2. Nachweisgrenzen mittels aufgetropfter Standards)

[pg]	LA-ICP-MS	SRXRF
Pr	0.11	79
Gd	0.78	89

Die Nachweisgrenzen, die mittels LA-ICP-MS für Praseodym und Gadolinium bestimmt wurden, liegen im oberen fg-Bereich bezüglich der Absolutmasse der Elemente. Mit der SRXRF konnten Nachweisgrenzen im mittleren pg-Bereich bestimmt werden. Da die mittels LA-ICP-MS ermittelten Nachweisgrenzen mit der SRXRF nur mit sehr langen Messzeiten pro Messpunkt – mit eventueller Schädigung des biologischen Materials oder einer Erhöhung der Spotgröße und dadurch einer geringeren Ortsauflösung – erreicht werden könnten, wurde der Schwerpunkt der Entwicklung eines Quantifizierungskonzeptes unter Matriceinfluss auf die LA-ICP-MS gelegt.

Die mit beiden Methoden ermittelten Nachweisgrenzen für Gadolinium und Praseodym reichen aus, um Gadolinium im oberen pg-Bereich in den Modellorganismen nachweisen zu können. Beide Methoden eignen sich also für die Fragestellung die Aufnahme und Verteilung von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln in Organismen zu untersuchen. Der besondere Vorteil der SRXRF – das zerstörungsfreie Messen – erlaubt die anschließende Analyse derselben Probe mittels LA-ICP-MS.

Zur Entwicklung der Methoden zur Untersuchung der Verteilung von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln wurden die biologischen Proben künstlich exponiert.

2. Wasserpflanzen – Fadenalgen

Als einfacher aquatischer Modellorganismus zur Untersuchung der Aufnahme und Abgabe gadoliniumbasierter Kontrastmittel wurden Fadenalgen gewählt, da diese wegen ihrer Größe besser handhabbar sind als die einzelligen Algen, die vielen aquatischen Lebewesen als Nahrung dienen.

Die für die Untersuchung der Gd-Aufnahme verwendeten Fadenalgen wurden sieben Tage lang 50 mg Gd l^{-1} Gd-DTPA-BMA-Lösung ausgesetzt. Ein Teil der Algen wurde sofort analysiert, während die restlichen Algen drei weitere Tage in gadoliniumfreier Nährlösung verbrachten.

Abbildung 22 zeigt ein Photo von Fadenalgen und die Intensitätsverteilungen von ^{158}Gd in den Fadenalgen nach sieben Tagen der Exposition (III-3.1 Aufnahme und Abgabe eines Kontrastmittels durch Fadenalgen) und nach weiteren drei Tagen in kontrastmittelfreier Lösung.

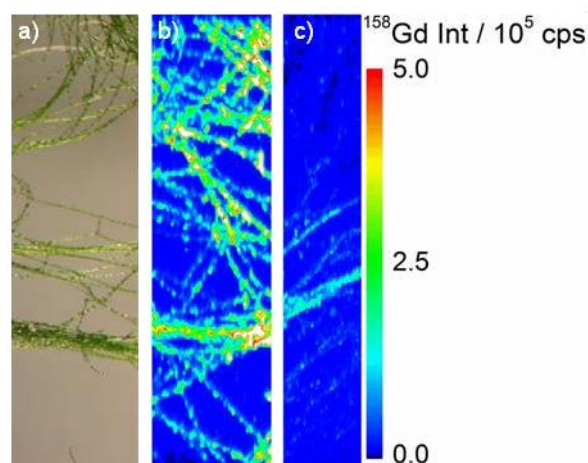


Abbildung 22: a) Photo von Fadenalgen; b) Intensitätsverteilung von ^{158}Gd in Fadenalgen nach 7 Tagen Exposition mit 50 mg l^{-1} Gd-DTPA-BMA (III-3.1 Aufnahme und Abgabe eines Kontrastmittels durch Fadenalgen; 7 d in 50 mg Gd l^{-1} Gd-DTPA-BMA-Lösung); Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 1.2 J cm^{-2} , Laserspotgröße $15 \text{ }\mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit $50 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, Wiederholrate 20 Hz , ablatierte Fläche $0.8 \times 3.2 \text{ mm}^2$; c) Intensitätsverteilung von ^{158}Gd in Fadenalgen nach 7 Tagen Exposition mit 50 mg l^{-1} Gd-DTPA-BMA und 3 Tagen in Gd-freier Nährlösung (III-3.1 Aufnahme und Abgabe eines Kontrastmittels durch Fadenalgen; 7 d bei 50 mg Gd l^{-1} Gd-DTPA-BMA-Lösung + 3 d Gd-freie Nährlösung); Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 7.9 J cm^{-2} , Laserspotgröße $15 \text{ }\mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit $50 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, Wiederholrate 20 Hz , ablatierte Fläche $0.7 \times 4.1 \text{ mm}^2$

Auf dem mittleren Bild sind die ^{158}Gd -Intensitäten in den Algen hoch und deutlich vom Untergrund unterscheidbar. Das Gadolinium wird also trotz des Waschens der exponierten Algen detektiert.

Innerhalb der untersuchten Algen zeigen sich wegen der erhöhten Gd-Ablation pro Laserschuss Intensitätserhöhungen an Knotenpunkten, an denen mehrere Fäden übereinanderliegen.

Das linke Bild mit den Algen nach drei zusätzlichen Tagen in einer gadoliniumfreien Umgebung weist nur noch geringe ^{158}Gd -Intensitäten auf. Der Vergleich der beiden Intensitätsverteilungsbilder in Abbildung 22 zeigt, dass das Kontrastmittel von den Algen auch wieder desorbiert werden kann, denn die Intensitäten von ^{158}Gd haben sich nach drei Tagen auf etwa ein Zehntel der ursprünglichen Intensitäten reduziert.

Da die Algen das Kontrastmittel wieder abgeben können, wird angenommen, dass der Aufnahme- und Abgabeprozess diffusionsgetrieben ist, vorausgesetzt, dass es sich bei diesem Ergebnis nicht um eine reine Adsorption gehandelt hat.

3. Schwimmpflanzen – Wasserlinsen

Die Wasserlinse wurde als größerer Organismus genutzt, um neben der Aufnahme der gadoliniumbasierten Kontrastmittel auch deren Verteilung untersuchen zu können. Die folgenden Experimente sollen zusätzlich die Abhängigkeit der Gadoliniumaufnahme von der Konzentration an Gadolinium in der Nährlösung und der Expositionszeit zeigen, um zu bestätigen oder zu widerlegen, dass der Aufnahmeprozess diffusionsgetrieben ist.

3.1 Konzentrationsabhängige Aufnahme Gd-basierter Kontrastmittel

Die Wasserlinsen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Gd-DTPA-BAM über die gleiche Dauer exponiert. Die hohe Komplexbildungskonstante von Gd mit DTPA-BMA ($\log K = 16.85^{[7]}$) erlaubt die Annahme, dass der Komplex unter den milden Bedingungen während der Aufnahme durch die Pflanze stabil bleibt^[14]. Viele essentielle Elemente aus der Nährlösung (wie z. B. Ca^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+}) besitzen mit DTPA-BMA geringere Komplexbildungskonstanten^[41] und können so das Gadolinium nicht aus seinem Komplex verdrängen.

Alle exponierten Pflanzen zeigen Gd-Signale. Die Gd-Intensitäten steigen mit der Konzentration in der Nährlösung. Die Kontrollprobe zeigt Gd-Signale zwischen 0 und 500 cps und wird als Blindwert interpretiert. Das Trägermaterial (Klebeband) um die Wasserlinsen herum erzeugt keine nennenswerten Gd-Signale. Im mittleren Bereich der Blätter der exponierten Pflanzen sind die Gd-Intensitäten gering und gleichmäßig verteilt, während ein Konzentrationsgradient mit steigenden Gd-Intensitäten zu den Rändern hin erkennbar ist. Die höchsten Gd-Intensitäten zeigt wie erwartet die Pflanze, die mit 10 mg Gd l^{-1} exponiert wurde, im Bereich des Überlapps zweier Blätter, wegen der erhöhten Menge ablatierten Materials.

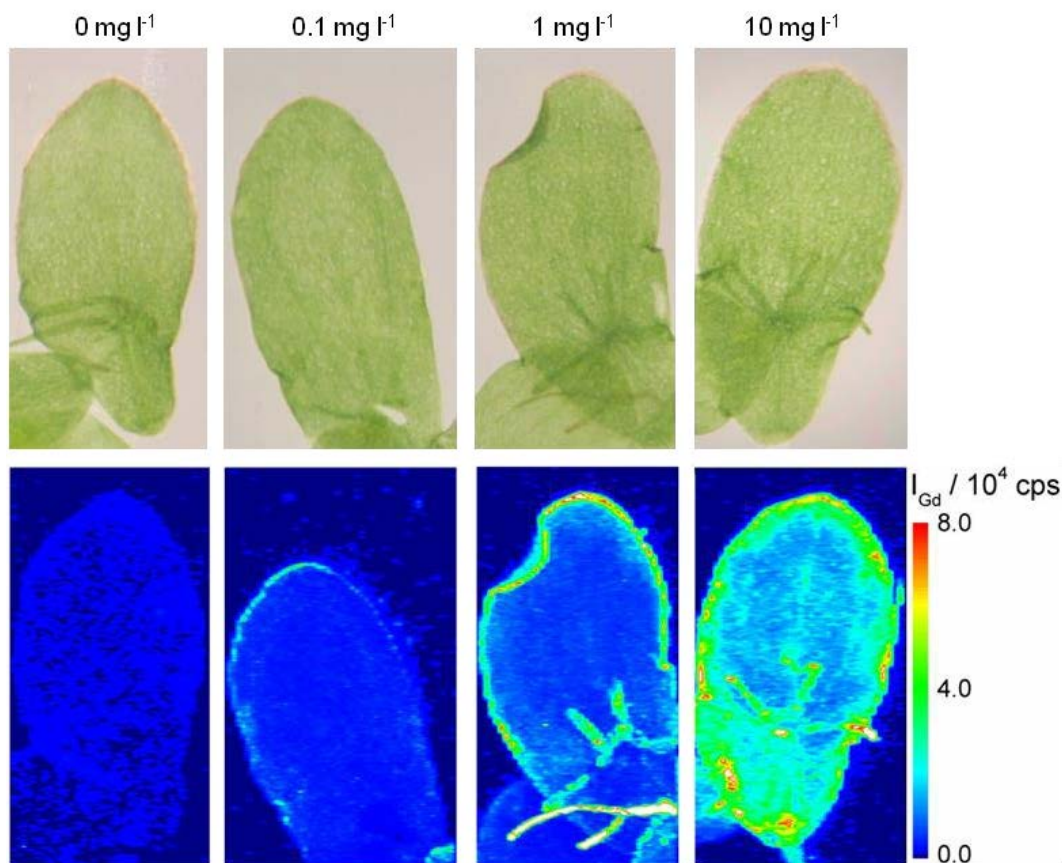


Abbildung 23: Photos und LA-ICP-MS-Intensitätsverteilungen von ^{158}Gd in Wasserlinsen nach einer Expositionsdauer von 7 Tagen in verschiedenen Konzentrationen (0 mg Gd l^{-1} , 0.1 mg Gd l^{-1} , 1 mg Gd l^{-1} und 10 mg Gd l^{-1}) Gd-DTPA-BMA (III-4.2 Konzentrationsabhängige Aufnahme des Kontrastmittels durch Wasserlinsen); Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke: 0.72 J cm^{-2} , Laserspotgröße: $50 \text{ }\mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit: $25 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, Ablationsgas: He, ablatierte Fläche: $2.5 \times 3.9 \text{ mm}^2$

Die Wurzelfäden sind im unteren Bereich der LA-ICP-MS-Bilder mit Gd-Konzentrationen von 1 und 10 mg l^{-1} sichtbar (intensiver fadenförmiger Bereich in der Mitte der Blätter). Die Wurzel der mit 0.1 mg Gd l^{-1} exponierten Wasserlinsenpflanze zeigt keine signifikanten ^{158}Gd Signale im LA-ICP-MS-Verteilungsdiagramm. Vermutlich ist die geringe Gd-Aufnahme in die Wurzeln der Grund dafür.

Der Vergleich der Intensitäten der verschiedenen Elementverteilungen zeigt einen klaren Trend. Die durchschnittliche Intensität in den Verteilungsbildern der exponierten Wasserlinsen verhält sich proportional zur Konzentration von Gadolinium in der Expositionslösung. Das heißt, eine höhere Konzentration des Gadoliniums in der Expositionslösung der Wasserlinsen führt zu einer erhöhten Aufnahme. Die relative Verteilung von Gadolinium ändert sich jedoch nicht mit Konzentrationsvariationen.

Die Wasserlinse ist eine schwimmende Wasserpflanze. Die Pflanzen bilden kleine mit Luft gefüllte Hohlräume unter den Blättern, um an der Wasseroberfläche zu schwimmen,

so dass hauptsächlich die Blattränder das Wasser berühren. Die Wurzelfäden dienen vorwiegend der Stabilisierung und die Nährstoffe werden hauptsächlich über die Blätter aufgenommen. So können Kontrastmittel über die Wurzel aufgenommen oder direkt von den Blättern absorbiert werden, wenn diese in Kontakt mit der Expositionslösung kommen. Bei allen exponierten Pflanzen sind die Intensitäten an den Rändern der Wasserlinsen etwa viermal höher verglichen mit denen in der Mitte der Blätter.

Die höheren Intensitäten von Gadolinium in den Wasserlinsen bei höheren Expositionskonzentrationen verstärken die Vermutung, dass die Aufnahme diffusionsgetrieben abläuft, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Wenn es sich hierbei nicht um eine reine Adsorption handelt, ist eine Verteilung von Gadolinium im Pflanzengewebe zu erwarten.

3.2 Zeitabhängige Aufnahme Gd-basierter Kontrastmittel

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die Aufnahme von Kontrastmitteln diffusionsgetrieben abläuft, wurde die zeitliche Abhängigkeit der Aufnahme gadoliniumbasierter Kontrastmittel an Wasserlinsen untersucht. Weiterhin soll geklärt werden, ob die Dauer der Exposition einen Einfluss auf die Verteilung von Gadolinium und dessen Gehalt in den Pflanzen hat. Dafür wurden Wasserlinsen mit Gd-DTPA-BMA für 0, 1, 2, 5 und 7 Tage mit einer Gd-Konzentration von 10 mg l^{-1} exponiert.

Abbildung 24 zeigt die Photos und die LA-ICP-MS-Intensitätsverteilungen von ^{158}Gd in den exponierten Wasserlinsen. Die Pflanzenadern, -zellen und einige Wurzelfäden (fünf Tages Probe) sind erkennbar.

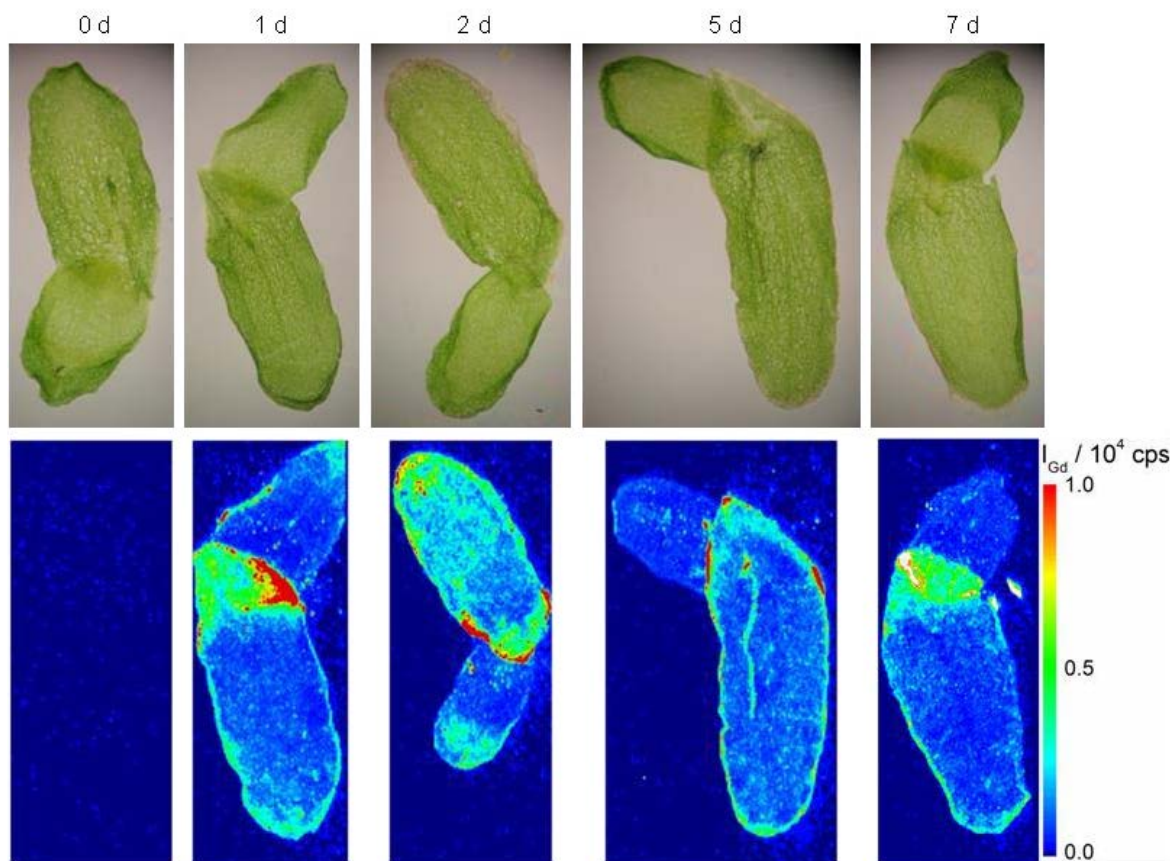


Abbildung 24: Photo und LA-ICP-MS-Intensitätsverteilungen von ^{158}Gd in Wasserlinsen nach 0, 1, 2, 5 und 7 Tagen der Exposition mit 10 mg Gd l^{-1} Gd-DTPA-BMA-Lösung (III-4.3 Zeitabhängige Aufnahme des Kontrastmittels durch Wasserlinsen); Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke: 1.5 J cm^{-2} (0 – 2 d), 1.0 J cm^{-2} (5 & 7 d), Laserspotgröße: $25 \text{ }\mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit: $50 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, Ablationsgas: Ar, ablatierte Fläche: $(1.5 - 2.6) \times 5.0 \text{ mm}^2$

In der Kontrollprobe (0 Tage) wurde kein Gadolinium detektiert. Nach einem Tag der Exposition konnte bereits Gadolinium in der Pflanze nachgewiesen werden. Auch in den Wasserlinsen, die länger exponiert wurden, konnte Gadolinium nachgewiesen werden. Die höchsten Intensitäten finden sich hier – genau wie im vorigen Kapitel „IV-3.1 Konzentrationsabhängige Aufnahme Gd-basierter Kontrastmittel“ – an den Blatträndern wieder, wegen des direkten Kontaktes mit der Expositionslösung. Die Verteilung und auch die Intensitäten von Gadolinium ändert sich mit zunehmender Expositionsdauer nicht, was – unabhängig vom Aufnahmemechanismus – darauf schließen lässt, dass eine Sättigung oder ein Gleichgewicht zwischen der Expositionslösung und den Pflanzen erreicht wird. Eine zeitabhängige Anreicherung von Gd in den Wasserlinsen nach einem Tag konnte nicht beobachtet werden. Dadurch konnte die Vermutung, dass es sich bei der Aufnahme der gadoliniumbasierten Kontrastmittel um einen diffusionsgetriebenen Prozess handelt, bestärkt werden. Aber auch die Adsorption an der Oberfläche der Wasser-

linsen kann nicht ausgeschlossen werden. Dieser positive Befund war die Motivation für weitere Pflanzenexperimente mit Landpflanzen.

Unabhängig vom Aufnahmemechanismus zeigen diese Experimente, dass der Transport von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln in diesem Konzentrationsbereich in die menschliche Nahrungskette durch die Exposition von Pflanzen durch kontaminiertes Wasser möglich ist. Ob dies auch für die geringeren in der Natur vorkommenden Konzentrationen gilt, muss noch geprüft werden.

4. Landpflanzen – Kresse

Mit den Experimenten an den Wasserlinsen wurde die Gd Aufnahme über die Wurzeln und die Oberfläche der Blätter analysiert. Um den Aufnahmeweg allein über die Wurzeln zu untersuchen, wurden die folgenden Experimente mit einer Landpflanze, der Gartenkresse durchgeführt. Landpflanzen nehmen das Wasser und die Nährstoffe über ihre Wurzeln auf. Das ist ein wichtiger Vorteil bei der Untersuchung der verschiedenen Aufnahmewege von Kontrastmitteln, die in den Experimenten mit den Wasserlinsen nicht unterschieden wurden. Zudem können die Blätter, die Stängel und die Wurzeln separat analysiert werden.

Gartenkresse (*Lepidium sativum*) wurde als Modellorganismus gewählt, weil die Blätter klein sind, aber trotzdem gut erkennbare Strukturen aufweisen. Außerdem kann sie schnell und einfach auf nährstoffarmen Substraten gezüchtet werden. Um die Aufnahme des Kontrastmittels in die Kresse zu überprüfen, wurden die einzelnen Kompartimente zunächst mittels ICP-MS nach einem Aufschluss untersucht.

4.1 Lösungsanalytik nach Aufschluss

Es soll nun geklärt werden, ob gadoliniumbasierte Kontrastmittel von der Kresse über die Wurzeln aufgenommen werden können. Dafür wurden die einzelnen Kompartimente der Kressepflanzen – Blätter, Stängel und Wurzeln – nachdem die Pflanzen zwei Tage mit 10 mg Gd l^{-1} Gd-DOTA-Lösung kultiviert wurden (siehe III-5.1.1 Gesamtbestimmung von Gd nach Aufschluss), aufgeschlossen (siehe III-5.3 Mikrowellenaufschlüsse von Kresse). Mittels ICP-MS mit einem Flüssigprobeneintragssystem (siehe II-2.1.6.1 Flüssigprobeneintrag) konnte der mittlere Gehalt von Gadolinium in den Bestandteilen der Kresse bezogen auf die Trocken- und Feuchtmasse bestimmt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Biokonzentrationsfaktor nach Isnard und Lambert^[197] berechnet.

Dieses Experiment zeigt eine Aufnahme von Gd-DOTA in signifikanten Mengen über die Nährlösung in alle Teile der Pflanze. Die höchsten Gehalte finden sich in den Kresseblättern wieder (Tabelle 15). Äußere Schädigungen an den Pflanzen wurden nicht beobachtet.

Tabelle 15: Mittels ICP-MS bestimmte Gehalte in Feucht- und Trockenmasse von Kresse (zwei Tage in 10 mg Gd kg⁻¹ Gd-DOTA-Lösung, siehe III-5.1.1 Gesamtbestimmung von Gd nach Aufschluss) in den verschiedenen aufgeschlossenen Kressekompartimenten nach einem Mikrowellenaufschluss

Kresse-kompartimente	Gehalt in mg Gd kg ⁻¹ Feuchtmasse	Gehalt in mg Gd kg ⁻¹ Trockenmasse	Bio-konzentrationsfaktor
Blätter	10.3	74.7	1.0
Stängel	0.9	18.1	0.1
Wurzel	1.7	33.5	0.2

Da das gadoliniumhaltige Kontrastmittel in allen untersuchten Teilen der Kressepflanzen nachgewiesen werden konnte, muss es die Wurzeln passiert und sich über den Transport durch die Stängel in den Blättern verteilt haben. Dabei ist der Gehalt an Gadolinium in den Blättern fünf- bis zehnmal so hoch, wie der in den Wurzeln bzw. Stängeln.

Im Normalfall schützt sich die Pflanze vor zu großen Molekülen durch den Casparischen Streifen (siehe II-3. Untersuchte Modellorganismen), der den unkontrollierten Stofftransport zum Zentralzylinder der Wurzel verhindert. Alle Substanzen, die aufgenommen werden, müssen die Zelle passieren und werden dort selektiert. Dieses Schutzsystem ist allerdings bei jungen Pflanzen – wie den Kressekeimlingen – und in den Spitzen wachsender Wurzeln noch nicht vollständig ausgebildet^[187], so dass der Komplex leicht über den apoplastischen Raum aufgenommen werden kann^[188].

Um die Menge des absorbierten komplexierten Gadoliniums mit der Konzentration in der Nährlösung vergleichen zu können, wurde der Biokonzentrationsfaktor bestimmt. Dieser berechnet sich aus dem Verhältnis der Menge an Gadolinium in der Feuchtmasse der Probe und der Expositionskonzentration in der Nährlösung. Bei einem berechneten Faktor von 1.0 ist also der Gehalt im untersuchten Gewebe bezogen auf die Feuchtmasse gleich dem Gehalt in der Expositionslösung^[14]. Wenn der Faktor größer als 1.0 ist, hat eine Anreicherung im Gewebe stattgefunden und bei einem Faktor kleiner als 1.0, war die Aufnahme in der Pflanze bezogen auf die Feuchtmasse geringer als in der Nährlösung.

In dem vorgestellten Experiment ist der Gehalt in den Blättern am höchsten verglichen mit den anderen Kompartimenten. Hier hat sich ein Biokonzentrationsfaktor von 1.0 eingestellt. In den Blättern ist also der Massenanteil an Gadolinium genauso hoch, wie in der Nährlösung. Dieser Anteil steigt aber auch bei längeren Expositionszeiten nicht weiter an^[14]. Wie auch schon bei den Wasserlinsen (IV-3.2 Zeitabhängige Aufnahme Gd-basierter Kontrastmittel), scheint sich ein Gleichgewicht zwischen der Gd-Konzentration

in der Nährlösung und dem Gd-Gehalt in den Kresseblättern einzustellen, was auch hier wieder auf den diffusionsgetriebenen Transport des Kontrastmittels durch die Pflanze deutet.

Da der Wassergehalt in allen Kompartimenten der Kresse ähnlich ist^[14], wurde eine homogene Verteilung von Gadolinium bezüglich der einzelnen Kressekompartimente erwartet. In den Stängeln und Wurzeln wurde jedoch deutlich weniger Gadolinium nachgewiesen. Die Biokonzentrationsfaktoren wurden mit 0.1 für die Stängel und 0.2 für die Wurzeln bestimmt. Die Kressepflanze erkennt also vermutlich das Gd-Chelat nicht als Nährstoff, der in diesen Kompartimenten abgelagert werden soll. Aufgrund der geringen Biokonzentrationsfaktoren in den Stängeln und den Wurzeln kann auch angenommen werden, dass der Wasseraustausch in den Zellen innerhalb der zwei Expositionstage nicht vollständig war. Außerdem wird vermutet, dass sich die geringen Gd-Mengen, die in den Stängeln und Wurzeln detektiert wurden, vorwiegend in den Transportkapillaren des Zentralzylinders auf dem Weg in die Blätter befanden.

Das oben gezeigte Ergebnis steht in Kontrast zu anderen Experimenten, bei denen für hydrophile Verbindungen, wie das gadoliniumbasierte Chelat, deutlich geringere Biokonzentrationsfaktoren gefunden wurden^[197]. Für die Klärung des Mechanismus der Aufnahme und des Transportes sind weitere Experimente nötig.

Dieses Experiment zeigt, dass die Aufnahme von Gadolinium durch Kresse und der Transport des Gadoliniums zu den Kresseblättern möglich sind. In einer parallel laufenden Doktorarbeit von Herrn Uwe Lindner wird durch Speziationsanalytik untersucht, ob das Kontrastmittel selbst oder ein Metabolit transportiert wird.

4.2 Verteilung von Gadolinium in Blatt, Stängel & Wurzel

Um der Vermutung der diffusionsgetriebenen Aufnahme von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln durch die Kressepflanze aus der Analyse der aufgeschlossenen Kressekompartimente (IV-4.1 Lösungsanalytik nach Aufschluss) nachzugehen, wurde die Verteilung von Gadolinium in allen Teilen der Kresse stichprobenartig mittels LA-ICP-MS untersucht. Zunächst wurden Kressepflanzen mit 10 mg Gd l⁻¹ Gd-DTPA-Lösung exponiert (siehe III-5.1.2 Bestimmung der Gd-Verteilung mittels μ -SRXRF und LA-ICP-MS). In diesem Fall wurden neun Tage als Expositionsdauer gewählt (statt zwei Tage wie in III-In Vorbereitung auf die Messungen wurden die Kressekeimlinge unterschiedlich kultiviert. Im Folgenden sind diese Vorbereitungen beschrieben, wobei die Abschnitte dieselben Über-

schriften tragen, wie die Abschnitte im Ergebnis- und Diskussionsteil, in dem die jeweiligen Resultate vorgestellt und diskutiert werden.

5.1.1 Gesamtbestimmung von Gd nach Aufschluss & IV-4.1 Lösungsanalytik nach Aufschluss), weil diese Pflanzen vom Beginn der Aussaat exponiert wurden und erst eine gewisse Größe für die Ernte erreichen mussten, damit die Wurzeln ausgebildet und das Kontrastmittel aufgenommen werden konnte. Der Kontrastmittelgehalt in der Kresse sollte ausreichend hoch sein, um mit der in der Entwicklung befindlichen Methode mittels LA-ICP-MS Gd-Signale oberhalb der Nachweisgrenze zu gewährleisten. Die Blätter erreichten eine gut handhabbare Größe von 3-5 mm mit gut ausgebildeten Blattadern.

4.2.1 Messung von Gd in Kressekompartimenten mittels LA-ICP-MS

In Abbildung 25 sind die Photos einer vollständigen Kressepflanze, einer Vergrößerung des Kresseblattes und die mittels LA-ICP-MS gemessenen Intensitätsverteilungen von ^{158}Gd in den verschiedenen Teilen der Pflanze dargestellt. Gadolinium wurde in allen Kompartimenten der Kressepflanze detektiert. Die höchsten durchschnittlichen Intensitäten finden sich dabei in den Blattadern und am linken Blattrand. Die Wurzel zeigt hohe und homogen verteilte Gd-Signale. Wie von den Wasserlinsen bekannt, führt auch hier die Überlagerung der Wurzel mit einem Wurzelhaar zu höheren Gd-Signalen. Auch die hohe Gd-Intensität am linken Blattrand entsteht durch die Überlagerung von verschiedenen Gewebeschichten. Die geringsten durchschnittlichen Intensitäten wurden im Stängel gemessen. Dabei zeigt der zentrale Teil der Probe höhere Gd-Intensitäten als die äußeren Bereiche.

Die LA-ICP-MS-Gadolinium-Verteilungsmuster in der Kresseprobe stimmen mit den kürzlich veröffentlichten Ergebnissen der ICP-MS-Analyse von aufgeschlossenen Kompartimenten der Pflanze überein^[13].

Die erhöhten Intensitäten am linken Rand des Kresseblattes und etwa in der Mitte des Intensitätsverteilungsbildes der Wurzel treten aufgrund einer Überlagerung von mehreren Gewebeschichten auf. Dort wurde durch den erhöhten Abtrag der Probe auch mehr Gadolinium in den Messprozess eingetragen.

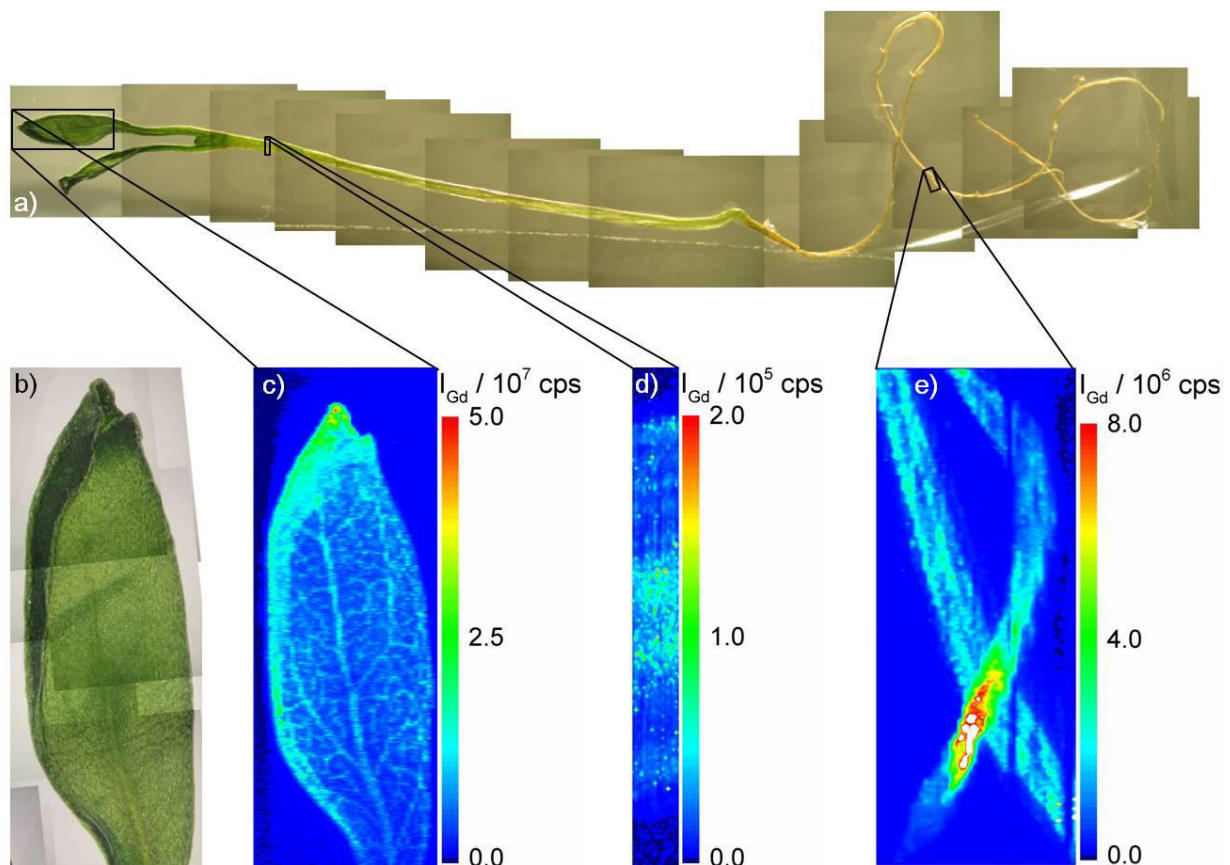


Abbildung 25: a) & b) Mikroskopbilder der untersuchten Kresse (III-5.1.2 Bestimmung der Gd-Verteilung mittels μ -SRXRF und LA-ICP-MS; 9 d in 10 mg Gd l⁻¹ Gd-DTPA-Lösung) und dessen Blatt; c) Intensitätsverteilung von ¹⁵⁸Gd im Kresseblatt; Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 5.7 J cm⁻², Laserspotgröße 50 μ m, Scangeschwindigkeit 15 μ m s⁻¹, Wiederholrate 20 Hz, ablatierte Fläche 1.9 \times 5.3 mm²; d) Intensitätsverteilung von ¹⁵⁸Gd in einem Teil des Stängels; Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 9.7 J cm⁻², Laserspotgröße 4 μ m, Scangeschwindigkeit 10 μ m s⁻¹, Wiederholrate 20 Hz, ablatierte Fläche 1.0 \times 7.6 mm²; e) Intensitätsverteilung von ¹⁵⁸Gd in einem Teil der Wurzel; Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 23.5 J cm⁻², Laserspotgröße 8 μ m, Scangeschwindigkeit 10 μ m s⁻¹, Wiederholrate 20 Hz, ablatierte Fläche 3.6 \times 9.0 mm²

Wie erwartet zeigt die Wurzel eine homogene Verteilung von Gadolinium, wegen der Aufnahme des Kontrastmittels über die Rinde und den Transport durch den Zentralzylinder zu den Blättern. Dadurch treten besonders die Gd-Intensitäten der Blattadern hervor. Von der Hauptblattader in der Mitte des Blattes kann das Kontrastmittel über die Nebenadern im ganzen Adersystem des Blattes verteilt werden und so die beobachteten erhöhten Gd-Intensitäten erzeugen.

Aufgrund der vorwiegenden Verteilung des Gadoliniums in den Wassertransportwegen wird angenommen, dass das Kontrastmittel mit dem Wasser in die Pflanze strömt und dort auch mit dem Transport des Wassers verteilt wird. Diese Annahme korrespondiert mit der Vermutung der diffusionsgetriebenen Aufnahme.

Die Frage, ob Kontrastmittel während der Aufnahme durch die Pflanzen stabil sind oder metabolisieren wurde bereits beantwortet^[13]. Nach fünf Tagen der Exposition von Kresse wurden keine oder minimale Veränderungen am Kontrastmittel festgestellt.

Die Aufnahme von Kontrastmitteln über die Wurzeln ist sehr überraschend, da nicht erwartet wurde, dass so große Moleküle das Schutzsystem der Wurzel passieren können. Normalerweise schützen sich Landpflanzen vor der Aufnahme zu großer Moleküle und der unkontrollierten Aufnahme von Stoffen mit dem Casparischen Streifen. Der Casparische Streifen ist eine Membran aus Lignin und Endodermin in der Endodermis. Er blockiert den Wasser- und Stofftransport durch den apoplastischen Raum zum Zentralzylinder der Wurzel. Der Casparische Streifen zwingt alle aufgenommenen Substanzen vom apoplastischen in den symplastischen Raum, wo sie selektiert werden. Wenn das metallumgebende Chelat den Siderophoren – dem benötigten Chelat für die Metallaufnahme – ähnlich ist, nimmt die Pflanze auch nicht essentielle Metallionen auf^[198]. In dieser Arbeit wurden die Keimlinge der Kresse untersucht. Vermutlich ist in diesen jungen Pflanzen der Casparische Streifen noch nicht vollständig ausgebildet^[187], wodurch Substanzen leicht über den apoplastischen Raum aufgenommen werden können^[188]. So kann das Gd die menschliche Nahrungskette über exponierte Landpflanzen – z. B. mit Oberflächenwasser bewässerte Felder mit Nutzpflanzen – erreichen.

4.2.2 Messung von Gd in einem Kresseblattes mittels SRXRF

Zusätzlich zur Gd-Verteilungen, die mit der LA-ICP-MS aufgenommen wurden, wurde ein Teil desselben Kresseblattes mit der SRXRF untersucht, um die erhaltenen Ergebnisse der LA-ICP-MS zu verifizieren und zu überprüfen, ob diese Methode auch zur Untersuchung von biologischen Proben geeignet ist.

Abbildung 26 zeigt das Photo desselben Kresseblattes, das mit der LA-ICP-MS untersucht wurde (vgl. Abbildung 25). Dabei erfolgte zuerst die Untersuchung mit der zerstörungsfreien SRXRF. Die mit der SRXRF gemessene Gd-Verteilung ist in Abbildung 26b dargestellt. Der Ausschnitt zeigt einen Teil der Hauptblattader, von der eine Nebenader abzweigt. Der Bereich der Adern ist etwa drei- bis viermal so intensiv wie das umliegende Gewebe.

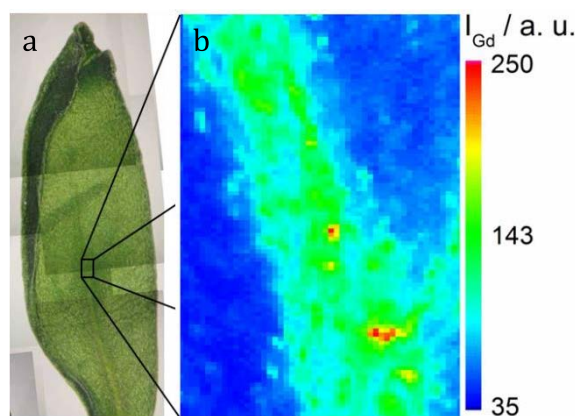


Abbildung 26: a) Photo eines Kresseblattes (dasselbe wie das mit der LA-ICP-MS untersuchte) und b) SRXRF-Intensitätsverteilung von Gadolinium; Messparameter: Strahlenergie 9 keV, Spotgröße $1 \times 1 \mu\text{m}^2$, Messzeit 9 s pro Pixel, untersuchte Fläche $51 \times 98 \mu\text{m}$

Mit diesem Experiment konnte erstmals erfolgreich die Intensitätsverteilung von Gadolinium in einem Kresseblatt mittels SRXRF visualisiert werden. Trotz der geringen Spotgröße von nur $1 \mu\text{m}$ wurden ausreichend hohe Intensitäten erreicht. Außerdem wurde das Ergebnis der LA-ICP-MS, dass sich das Gadolinium vorwiegend in den Blattadern befindet, bestätigt.

4.3 Verteilung von Cd im Kresseblatt

Nicht alle im Nährmedium enthaltenen Elemente werden von der Kresse in gleicher Weise aufgenommen. Von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln ist bekannt, dass diese nicht^[199, 200] oder nur schwach^[201] an Proteine binden. Cadmium dagegen bildet Komplexe mit Pflanzenproteinen wie z. B. Phytochelatinen^[101, 202] und hat eine hohe Affinität zu Sulfhydrylgruppen^[203] oder anderen Proteinseitenketten, die Sauerstoff oder Stickstoff enthalten^[204]. Da die Proteine gleichmäßig in der Pflanze verteilt sind, liegt die Vermutung nahe, dass sich die Verteilung von Cadmium von der des Gadoliniums in einer Pflanze, die mit Verbindungen beider Elemente exponiert wurde, unterscheidet. Die Untersuchungen fanden beispielhaft an einem Kresseblatt statt.

Dazu wurde eine Kressecharge mit einer wasserlöslichen Cadmiumverbindung (10 mg Cd l^{-1} $3 \text{ CdSO}_4 \cdot 8 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung) und Gd-DTPA (10 mg Gd l^{-1} Gd-DTPA-Lösung) für acht Tage exponiert (III-5.1.3 Bestimmung der Cd- & Gd-Verteilung mittels LA-ICP-MS). Abbildung 27 zeigt die Verteilung der Isotope ^{112}Cd und ^{158}Gd in einem Kresseblatt. Wie bereits aus den vorherigen Experimenten bekannt ist, verteilt sich das Gadolinium entlang der Blattadern und reichert sich lokal am vorderen Blattrand an. Im unteren Bild

sind im vorderen Bereich des Blattes die kleinen Blattadern durch die höheren ^{158}Gd -Intensitäten deutlich erkennbar. Die Gd-Intensitäten im Bereich der Hauptblattader sind allerdings entgegen der bisherigen Erkenntnisse kaum vom umgebenden Gewebe unterscheidbar. Demzufolge könnte das aufgenommene Cadmium einen Einfluss auf die Gd-Verteilung haben. Das Cadmium ist über das gesamte Blatt mit vielen Hotspots verteilt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Proteine, an die das Cadmium bindet über das gesamte Blatt verteilt sind.

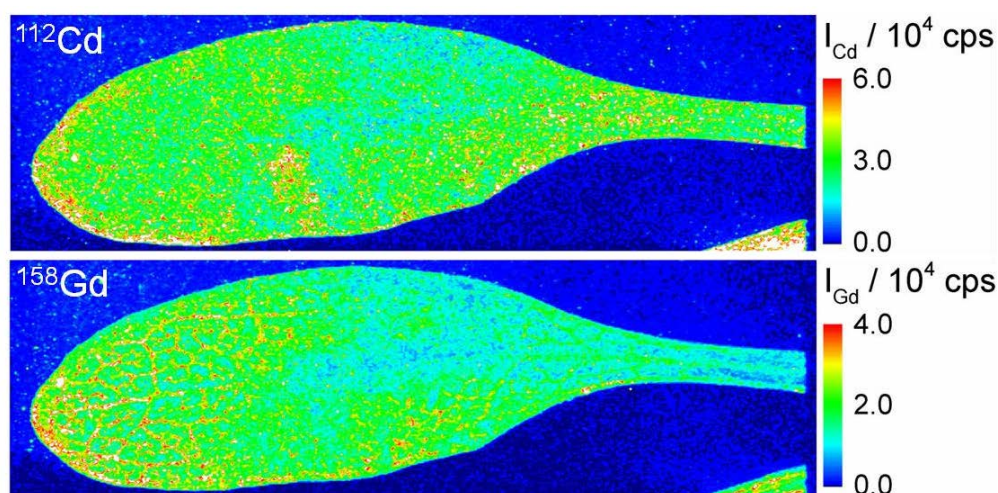


Abbildung 27: LA-ICP-MS-Verteilungen von ^{112}Cd und ^{158}Gd in einem Kresseblatt (III-5.1.3 Bestimmung der Cd- & Gd-Verteilung mittels LA-ICP-MS, acht Tage auf Sand mit $10\text{ mg Cd und Gd kg}^{-1}$); Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 1.5 J cm^{-2} , Laserspotgröße $25\text{ }\mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit $50\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, Wiederholrate 20 Hz , ablatierte Fläche: $11.1 \times 3.3\text{ mm}^2$

Die These, dass sich das Cadmium anders als das Gadolinium verteilt, konnte mit diesem Experiment bestätigt werden. Der Gd-Komplex bindet also im Gegensatz zu Cd nicht oder nur schwach an Proteine.

Wegen seiner akuten Toxizität und damit der Veränderung von Prozessen in der Pflanze^[101, 203] wurde Cadmium nicht als interner Standard verwendet.

4.4 Verteilung von Pr im Kresseblatt

Da es bezüglich der Bestimmung von Gadolinium in Kresse mittels SRXRF Einschränkungen wegen möglicher Interferenzen mit den Linien von Mangan und Eisen gab, wurde ein zweites äquivalent chelatisiertes Zentralion eingeführt. Dafür wurde Praseodym gewählt, weil es interferenzfrei mit der SRXRF in Kresse untersucht werden kann und auch für Voruntersuchungen mittels LA-ICP-MS genutzt werden kann. Als Reinelement ist ^{141}Pr besonders empfindlich nachweisbar. Um das Praseodym mit dem Gadolinium vergleichen

zu können, muss zunächst die gleiche Verteilung der beiden Elemente im Kresseblatt bestätigt werden.

Für die Untersuchung wurden Kressepflanzen für 7×2 h 100 mg Gd und Pr l^{-1} Gd-DOTA- und Pr-DOTA-Lösung ausgesetzt (III-5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, μ -SRXRF & LA-ICP-MS). Die Expositionszeiten wurden hier aufgeteilt, um das Experiment reproduzierbarer zu machen. Nach jeder Exposition wurden die Wurzeln durch mehrfaches Tränken in Wasser gewaschen. Da die gesamte Expositionsdauer dadurch relativ kurz war (14 h), wurde hier die Konzentration des Kontrastmittels im Vergleich zu vorigen Experimenten erhöht.

Die erhaltene Verteilung der Intensitäten ist in Abbildung 28 dargestellt. Praseodym und Gadolinium sind nahezu gleich verteilt. ^{141}Pr ist allerdings empfindlicher nachweisbar als ^{158}Gd , weil es mit 100 % Isotopenhäufigkeit bei gleichem Gehalt etwa viermal häufiger vorhanden ist als ^{158}Gd mit 24.8 %. Die höchsten Intensitäten finden sich entlang der Blattadern wieder. Von der Hauptblattader in der Mitte kann das Kontrastmittel zu den kleineren Adern und zur Spitze des Blattes transportiert werden, wo das Wasser verdunstet und das Kontrastmittel zurückbleibt.

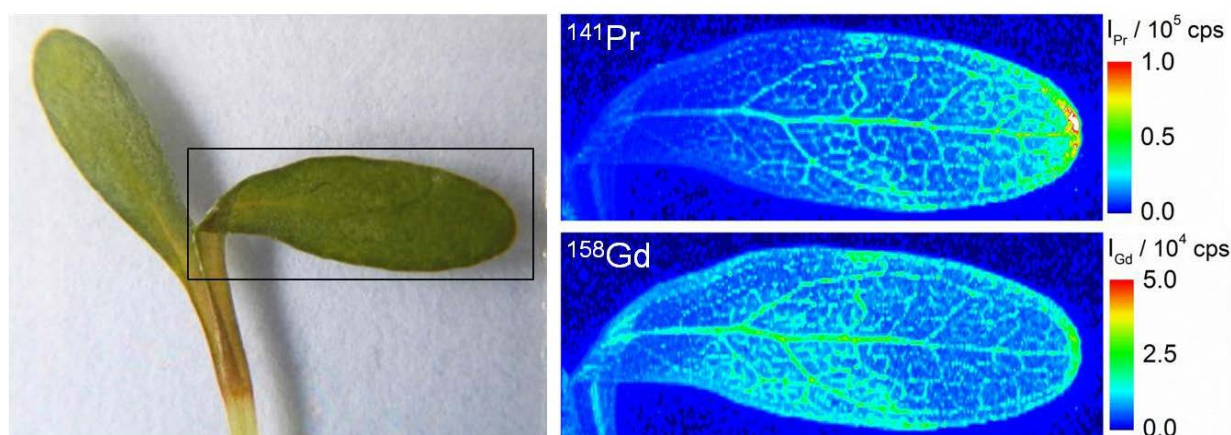


Abbildung 28: links: Photo einer Kressepflanze (III-5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, μ -SRXRF & LA-ICP-MS; 7×2 h in 100 mg Gd und Pr l^{-1} Gd-DOTA- und Pr-DOTA-Lösung auf Polystyrol-Granulat); **oben rechts:** LA-ICP-MS-Verteilung von ^{141}Pr im rechten Blatt der Pflanze; **unten rechts:** LA-ICP-MS-Verteilung von ^{158}Gd im rechten Blatt der Pflanze; Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 4.6 J cm^{-2} , Laserspotgröße $50 \text{ }\mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit $30 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, ablatierte Fläche: $7.1 \times 2.7 \text{ mm}^2$

Da sich das komplexierte Praseodym ähnlich verteilt, wie das komplexierte Gadolinium, aber anders als das freie Cadmium, liegt der Schluss nahe, dass das Chelat einen Einfluss auf die Art der Verteilung des metallischen Ions hat. Der Komplex schirmt das Zentralion

ab, so dass es lediglich mit dem Wasser transportiert wird und nicht in der Pflanze bindet. Unterschiede in der Verteilung von Gd-DOTA und Pr-DOTA sind vermutlich auf unterschiedliche Ionengrößen von Gd^{3+} und Pr^{3+} und damit leicht verschiedene Konformationen des Komplexes zurückzuführen.

Für eine Abschätzung des Gadoliniumgehaltes in einem Kresseblatt mittels SRXRF wäre Praseodym aufgrund der ähnlichen Aufnahme also geeignet.

4.5 Standard zum Ausgleich von Variationen des Messsignals

Für eine robuste und reproduzierbare Quantifizierung von Analyten ist ein interner Standard meist unablässig^[205], wie bereits in „II-2.1.6.2.1 Interner Standard“ erläutert wurde. Er dient dazu Variationen, die während der Messung auftreten, zu korrigieren. Diese können verschiedene Ursachen haben. Sie können zum Beispiel durch die Probe selbst oder durch die Messgeräte verursacht werden. Im Fall der Quantifizierung von Gadolinium aus gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln in Kresse sind die Quellen von auftretenden Variationen während der Messung das biologische Gewebe und das LA-ICP-MS-System. Das LA-ICP-MS-System unterliegt vergleichsweise geringen Variationen. Im Gewebe hingegen können diverse Inhomogenitäten auftreten. Zum einen kann die Dicke des ablatierten Gewebes in verschiedenen Arealen variieren. Da immer die vollständige Probe ablatiert wird, hat das einen entscheidenden Einfluss auf die Signalintensität des Analyten. In Arealen mit größerer Schichtdicke können so die Signalintensitäten des Analyten durch die erhöhte Ablation von Analyt steigen oder durch die erhöhte Ablation von Matrix sinken. Ein weiterer Parameter bei der Ablation, der für die Suche eines möglichen internen Standards berücksichtigt werden muss, ist die variierende Dichte im Gewebe. Ein perfekter interner Standard müsste im Gewebe homogen verteilt sein. Je nach Fragestellung müsste sich diese homogene Verteilung auf das Volumen oder die Zelldichte beziehen. Das häufig für biologische Matrices als interner Standard verwendete ^{13}C ist hier nicht geeignet, da als Probenträger zur Fixierung Klebeband verwendet wurde. Das Klebeband als Kunststoff besteht zum Großteil aus Kohlenstoff, so dass die ^{13}C -Signale von Probe und Probenträger kaum unterscheidbar sind.

Variationen der Signalintensitäten können kurzfristig auftreten oder längerfristige Driften sein. Um alle auftretenden Variationen ausgleichen zu können, muss ein Element/Isotop gefunden werden, dass sich homogen im Gewebe bezüglich der Zelldichte verteilt und ein dem Analyten möglichst ähnliches Verhalten während der Ablation, des

Transportes, im Plasma und im Massenspektrometer zeigt. Dies kann ein bereits im Gewebe vorhandenes oder ein zugefügtes Isotop/Element sein.

Für den Ausgleich der kurzfristigen und längerfristigen Gerätevariationen würde ein Standard ausreichen, der homogen auf der Oberfläche des zu untersuchenden Gewebes liegt. Dieser müsste bei einem stabilen System ein kontinuierlich gleiches Signal liefern.

Längerfristige Driften können ausgeglichen werden, indem ein Isotop in einer anderen als der zu untersuchenden Matrix gemessen wird, vorausgesetzt die Homogenität des Isotops in dieser Matrix kann gezeigt werden. So können zum Beispiel Messungen von Barium in einem Glasobjektträger, der das Barium homogen enthält, zum Ausgleich der Driften während der Messung einer biologischen Probe genutzt werden.

4.5.1 Essentielle Elemente

Das zu untersuchende biologische Gewebe unterliegt natürlichen Variationen in der Verteilung der Elemente und ist somit nicht homogen bezüglich der verwendeten örtlichen Auflösung. Zum einen kann in unterschiedlichen Bereichen die Dicke des Gewebes unterschiedlich sein. Zum anderen sind auch die Zellen in ihrer Form, Größe und Dichte nicht homogen im Organismus verteilt. Für die LA-ICP-MS ist es wichtig, einen Standard zu finden, der diese Variationen ausgleicht.

Standard zum Ausgleich verschiedener Gewebedicken und -dichten

Der erste Schritt auf der Suche nach einem internen Standard ist die Überprüfung der in der Pflanze bereits vorhandenen essentiellen Elemente. Die Voraussetzungen für den internen Standard sind dabei, die homogene Verteilung des Elementes in der Probenmatrix, ein ähnliches Verhalten wie der Analyt während des Verfahrens (Ablation, Transport, Ionisierung), die Interferenzfreiheit und – speziell bei bereits in der Matrix vorhandenen Elementen – ein ausreichend hoher Gehalt. Zum einen sollte der Gehalt dabei höher als der Gasblindwert und zum anderen deutlich unterscheidbar vom Signal des Probenträgers (Klebeband) sein. Für die Untersuchung wurden drei essentielle Elemente des Kresseblattes gewählt: Magnesium, Calcium und Kupfer. Auch Kohlenstoff wurde in Kresseblättern hinsichtlich der Eignung als interner Standard untersucht, musste aber aufgrund des hohen Blindwertes im Klebeband ausgeschlossen werden.

Zur Vorbereitung wurde die Kresse (III-5.1.5 Untersuchung der Verteilung von essentiellen Elementen) sieben Tage lang auf Sand kultiviert, der mit 10 mg kg^{-1} Gd-DTPA ver-

setzt war. Abbildung 29 zeigt die Intensitätsverteilungen von ^{25}Mg , ^{44}Ca , ^{63}Cu und ^{158}Gd . Alle Elemente liefern hohe Intensitäten im Bereich des Blattes, die von denen des Proben-trägers gut unterscheidbar sind. Die Verteilung der essentiellen Elemente Magnesium, Calcium und Kupfer unterscheidet sich wesentlich von der Verteilung von Gadolinium. Während Gadolinium wie erwartet lokal in den Blattadern und im vorderen Blattrand insbesondere der Blattspitze verteilt ist, sind die Blattadern bei den anderen gemessenen Isotopen nicht vom Rest des Blattes abgehoben.

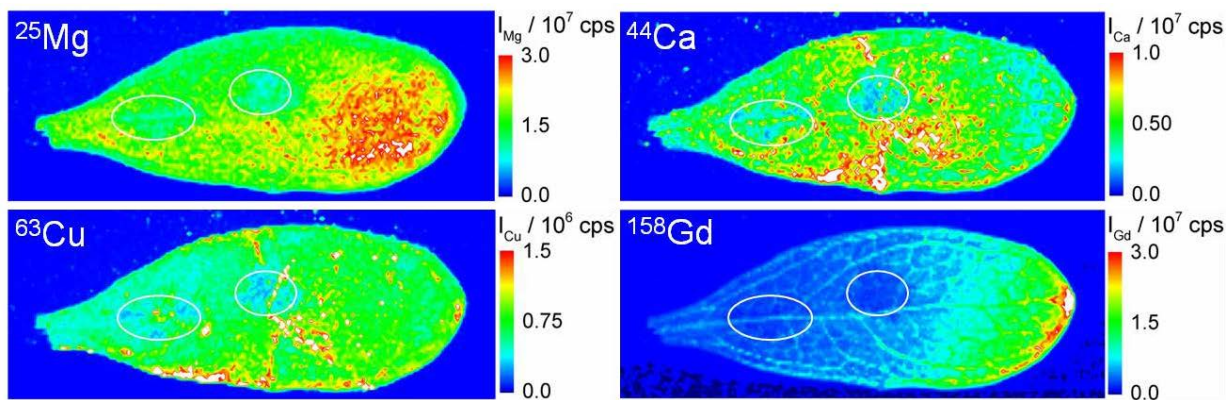


Abbildung 29: LA-ICP-MS-Intensitätsverteilungen von ^{25}Mg , ^{44}Ca , ^{63}Cu und ^{158}Gd in einem Kresseblattes (III-5.1.5 Untersuchung der Verteilung von essentiellen Elementen, 7 Tage auf Sand mit 10 mg Gd kg^{-1}), Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 2.0 J cm^{-2} , Laserspotgröße $50\text{ }\mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit $50\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, Wiederholrate 20 Hz , ablatierte Fläche: $8.1 \times 3.2\text{ mm}^2$; Die weiß umrahmten Felder markieren Bereiche mit geringerer Intensität bei allen vier Isotopen.

Auch die Verteilung der essentiellen Elemente im Vergleich zueinander ist sehr verschieden. Magnesium zeigt erhöhte Intensitäten im vorderen Bereich des Blattes aber nicht am Rand. Calcium und Kupfer haben ihre Signalerhöhungen am Rand aber auch im Inneren des Blattes. Alle Elemente verursachen sehr unterschiedliche Intensitätsverteilungen. Dennoch gibt es zwei Bereiche (Abbildung 29, weiß umrahmt), in denen alle gemessenen Isotope geringere Intensitäten als unmittelbar neben diesen Bereichen zeigen. Vermutlich war hier die Blattdicke/-dichte etwas geringer, so dass weniger Material und damit weniger Analyt ablatiert und analysiert werden konnte.

Kupfer ist von den untersuchten Elementen am besten als interner Standard geeignet, da dessen Intensitäten die geringsten Variationen aufweisen. Magnesium und Calcium eignen sich weniger, da beide Isotope (^{25}Mg und ^{44}Ca) Hotspots an verschiedenen Stellen des Blattes bilden und unklar ist, ob diese in direkten Zusammenhang mit der Blattphysiologie gebracht werden können.

Zur näheren Untersuchung der Eignung von ^{63}Cu als interner Standard wurden Gewebeschnitte von Kresseblättern, die in Paraffin eingebettet wurden, mittels LA-ICP-MS untersucht. Die Kressegewebeschnitte mussten entsprechend ihrer Gewebedicke unterschiedlich hohe ^{63}Cu -Intensitäten liefern. Die ^{63}Cu -Intensitäten reichten aber nicht aus, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Zudem veränderte sich das Gadoliniumsignal – durch Herauswaschen bei der Vorbereitung oder Verschmieren beim Schneiden – erheblich, so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

4.5.2 Iodierung von Kresseblättern

Giesen *et al.* zeigten, dass Iod geeignet ist, um Gewebeinhomogenitäten in Dünnschnitten von humanen Gewebe auszugleichen.

Im folgenden Experiment soll geprüft werden, ob es auch möglich ist, pflanzliches Gewebe, das nicht in Paraffin eingebettet und geschnitten ist, mit KI_3 zu iodieren. Dafür wurden ein getrocknetes und gepresstes Kresseblatt (III-5.1.4 Überprüfung von Iod als internen Standard), sowie ein frisch geerntetes Kresseblatt iodiert. Während der Iodierung bildeten sich – vor allem bei dem frischen Blatt – kurzzeitig kugelförmige Tropfen auf der Oberfläche der Blätter bis mehr KI_3 -Lösung zugegeben wurde. Dadurch unterschied sich die vierminütige Iodierungszeit um einige Sekunden an verschiedenen Stellen. Durch den Auftrieb der Blätter in der KI_3 -Lösung konnte auch danach keine gleichmäßige Benetzung des Iods mit der Kresseblattoberfläche gewährleistet werden.

Um trotzdem sowohl die grobe als auch die feine Verteilung des Iods beurteilen zu können, wurde ein Teil des Blattes mit einer Laserspotgröße von $6\text{ }\mu\text{m}$ und das restliche Blatt mit einer Laserspotgröße von $50\text{ }\mu\text{m}$ ablatiert. Ein guter Überblick kann durch die Zusammenfügung der Teile mit individuellen Intensitätsskalen erhalten werden (siehe Abbildung 30).

Die ^{158}Gd -Intensitätsverteilung zeigt, wie erwartet, bei beiden Kresseblättern erhöhte Signale entlang der Blattadern. Die Blätter können aufgrund experimenteller Unterschiede in der Probenvorbereitung (drei bzw. sechs Tage Exposition) nicht miteinander verglichen werden.

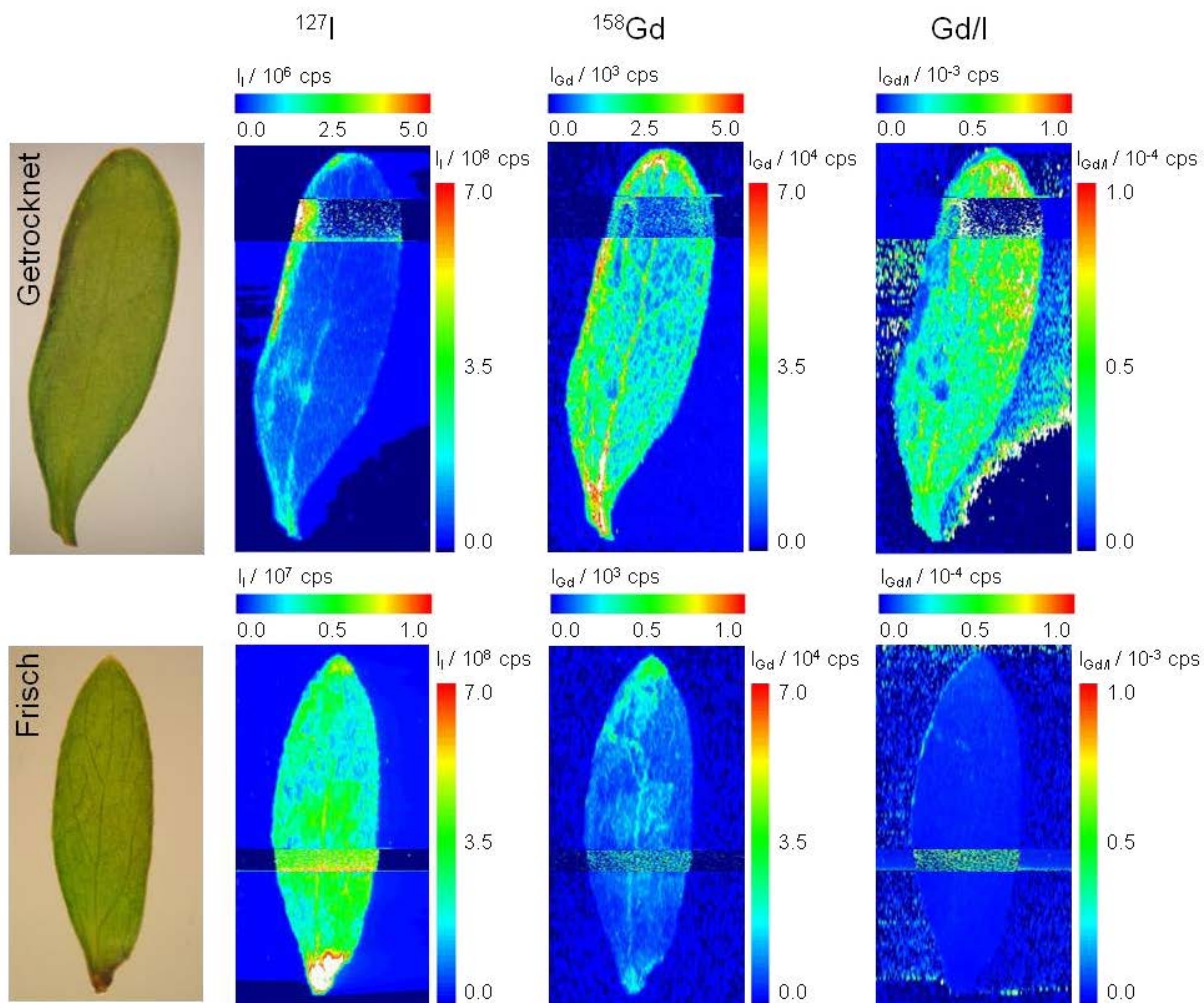


Abbildung 30: Lichtmikroskopbilder und Intensitätsverteilungen von ^{127}I , ^{158}Gd und deren Quotienten $^{158}\text{Gd}/^{127}\text{I}$ in iodierter getrockneter Kresse (III-5.1.4 Überprüfung von Iod als internen Standard; 6 d 5 mg Gd l⁻¹ Gd-DTPA-Lösung auf Watte, getrocknet und gepresst) und frischer Kresse (III-5.1.4 Überprüfung von Iod als internen Standard; 3 d 10 mg Gd l⁻¹ Gd-DTPA-Lösung auf Watte, frisch geerntet); Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 3.9 J cm⁻² für 50 µm Laserspotgröße und 3.8 J cm⁻² für 6 µm Laserspotgröße, Laserspotgröße oben und unten 50 µm und im mittleren Bereich 6 µm, Scangeschwindigkeit 30 µm s⁻¹, Wiederholrate 20 Hz, ablatierter Bereich 5.1 × 3.0 cm. Die Bereiche mit gleicher Laserspotgröße wurden mit gleicher Intensitätsskala dargestellt, sind aber in ihren Intensitäten nicht direkt mit dem Bereich vergleichbar, der mit geringerer Laserspotgröße ablatiert wurde. Diese Form der Darstellung dient lediglich dem Vergleich der Elementverteilungen. Die Intensitätsskala am rechten Bildrand bezieht sich auf die mit 50 µm gescannten Bereiche oben und unten, wobei die obere Skala jeweils zum mittleren Abschnitt gehört, der mit einer Laserspotgröße von 6 µm ablatiert wurde.

Bei den Verteilungsdiagrammen von ^{127}I fällt auf, dass die Intensität von Iod im getrockneten Blatt um 7-8 Größenordnungen schwankt. Eine homogene Verteilung des Iods bezüglich der Zelldichte ist also unwahrscheinlich. Außerdem ist die Auswaschzeit im Vergleich zum Gadolinium erhöht, wodurch die Verschmierungen rechts im Bild außerhalb

des Blattes zustande kommen. Grund dafür ist die Sublimation von ungebundenem Iod, das trotz des Waschens mit deionisiertem Wasser offenbar nicht vollständig entfernt wurde. Durch resublimiertes Iod im Messsystem kann ein Memoryeffekt entstanden sein. Da das frische Blatt direkt im Anschluss gemessen wurde, ist hier der gesamte Untergrund durch diesen Memoryeffekt im Vergleich zum Beginn der Messung des getrockneten Blattes erhöht.

Im frischen Kresseblatt erscheint die Verteilung von Iod homogener als im getrockneten Kresseblatt. Bereiche, in denen die Intensität erhöht ist, sind in ihrer Signalintensität auch beim Gadolinium erhöht. Dies spricht für eine Erhöhung der Blattdicke und damit einem größeren Materialabtrag an diesen Stellen. Die Intensitäten von Gadolinium sind im frischen Blatt deutlich geringer als im getrockneten Blatt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass während der Probenvorbereitung im frischen Blatt – durch den höheren Wassergehalt – das aufgenommene gadoliniumbasierte Kontrastmittel in die Iodlösung diffundieren konnte, so dass ein großer Teil verloren gegangen ist und sich auch die Verteilung verändert hat. Dass die Abgabe von aufgenommenem gadoliniumbasierten Kontrastmittel in Pflanzen möglich ist, wurde bereits an Fadenalgen gezeigt (siehe IV-2. Wasserpflanzen – Fadenalgen).

Um zu überprüfen, inwiefern sich das ^{158}Gd -Signal vom ^{127}I -Signal unterscheidet, wurde der Quotient der Intensitäten der Gadolinium- und Iodsignale $^{158}\text{Gd}/^{127}\text{I}$ gebildet. Die daraus entstandenen Intensitätsverteilungen sind ebenfalls in Abbildung 30 dargestellt. Auffällig ist, dass beim frischen Blatt keine Blattadern mehr zu erkennen sind. Iod verteilt sich im frischen Blatt also ähnlich wie Gadolinium. Unter der Annahme, dass sich Iod homogen in den Blättern der Kresse verteilt, wäre Gadolinium nicht, wie ursprünglich angenommen, in den Adern lokal angereichert, sondern ebenfalls gleichmäßig verteilt. Auch beim getrockneten Kresseblatt sind die Blattadern nur undeutlich erkennbar. Iod verteilt sich im Blatt also ähnlich wie Gadolinium.

Ein frisches Blatt kann Iod etwas gleichmäßiger aufnehmen, als ein getrocknetes und gepresstes Blatt. Es ist aber schwierig nachzuweisen, ob Iod als interner Standard geeignet ist, da die biologische Varianz sehr groß ist. Auch weil sich durch die Iodierung die Gadoliniumverteilung ändert bzw. bei der Probenvorbereitung das Kontrastmittel teilweise aus dem Kresseblatt gewaschen werden könnte, ist die wässrige Iodierung keine geeignete Methode zum Einbringen von Iod als Standard für die LA-ICP-MS.

Die Wasserlöslichkeit und die Möglichkeit der Sublimation und Resublimation lassen viele Versuche zu, das Iod homogen auf die Kresse zu bringen und somit als Standard zum Ausgleich von Gerätevariationen zu entwickeln. Für nähere Untersuchungen wurden Gewebeschnitte iodiert. Daraus ergaben sich jedoch mehrere Schwierigkeiten: Zum einen sind die Gewebeschnitte durch das Paraffin zu hydrophob, um gleichmäßig iodiert zu werden. Eine Entparaffinierung hätte allerdings den Verlust des ungebundenen Kontrastmittels zur Folge. Außerdem verschmiert das Gadolinium über die Gewebeschnittoberfläche, so dass eine Bestimmung der ursprünglichen Verteilung von Gadolinium im Kresseblatt nicht mehr möglich ist. Die größte Herausforderung stellt aber sicher der Evakuierungsprozess der Ablationszelle vor jeder Messung dar. Während der Evakuierung sublimiert das Iod, setzt sich in den Schläuchen ab und erzeugt so einen Memoryeffekt. Zudem verhält sich Iod – als leichtflüchtiger Analyt – in der Gasphase während des Ablationsprozesses und auch im Plasma anders als das Gadolinium in der Partikelphase^[206, 207]. Aufgrund dieser Schwierigkeiten, vor allem der Sublimationseigenschaften des Iods, führte auch dieser Ansatz nicht zu einem zufriedenstellenden Ergebnis.

4.5.3 Barium

Da das Iod als Standard für die Untersuchungen von Kresseblättern mittels LA-ICP-MS nicht infrage kommt, wurde ein anderes Element gesucht, das homogen in ein Material eingearbeitet ist, das in Abständen zwischen den Linienscans der biologischen Proben gemessen werden kann, um eventuelle längerfristige Gerätedriften auszugleichen. Barium als Spurenelement im Glasobjektträger scheint dafür ein aussichtsreiches Element zu sein.

Zur Veranschaulichung der Homogenität von Barium im Glasobjektträger, sind in Abbildung 31 (links) die ^{137}Ba -Intensitäten eines Linienscan graphisch dargestellt. Die rechte Seite der gleichen Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von ^{137}Ba der einzelnen Linienscans auf dem Objektträger während der 22-stündigen Messung eines Kresseblattes (siehe III-5.2.2 Barium). Es wurden alternierend immer zehn Linien auf der Probe ablatiert und eine auf dem Glasobjektträger, wobei die Mittellinien der Ablationskrater auf dem Objektträger einen Abstand von 100 μm hatten.

Zwischen dem Mittelwert des ersten und zweiten Linienscans ist die Abnahme in der Intensität von ^{137}Ba am gravierendsten. Die Ursache hierfür sind vermutlich zum einen Driften des ICP-MS und zum anderen unter dem Mikroskop sichtbare Ablagerungen von

Partikeln, die während der Ablation entstanden sind und zu schwer für den Transport im Gasstrom waren. Diese legten sich auf die Oberfläche des Objektträgers und erschwerten dadurch den Materialabtrag der folgenden Linienscans durch den Laser.

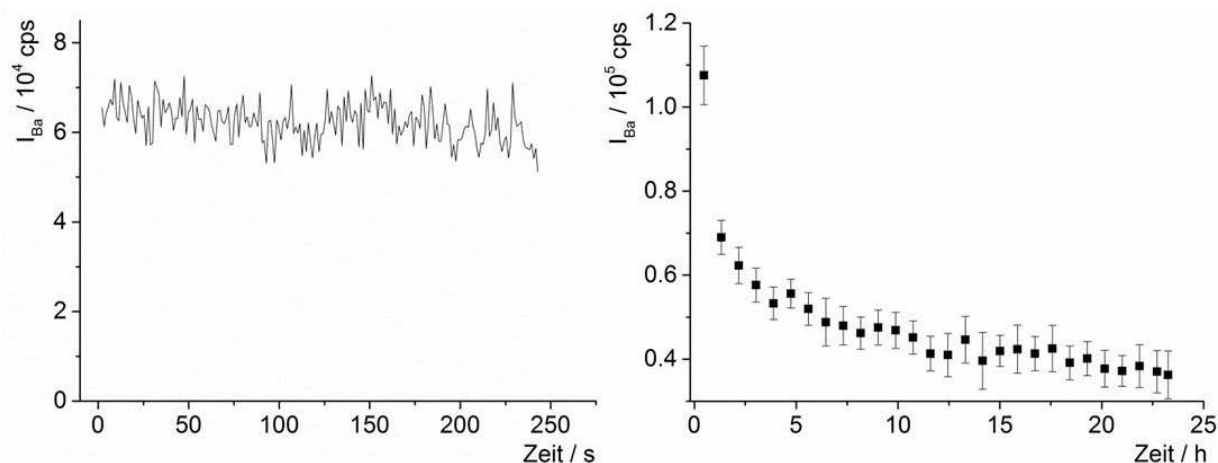


Abbildung 31: links: Intensitätsprofil von ^{137}Ba eines Linienscans auf einem Glasobjektträger; Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 2.3 mJ cm^{-2} , Laserspotgröße $50 \mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit $50 \mu\text{m s}^{-1}$, Wiederholrate 20 Hz, ablatierte Fläche $1.3 \times 12.1 \text{ mm}^2$; rechts: Gemittelte ^{137}Ba -Intensität mit Standardabweichungen der Normierungslinien während der Messung eines Kresseblattes

Mit vergrößerten Abständen zwischen den einzelnen Ablationsspuren ($350 \mu\text{m}$ statt $100 \mu\text{m}$) hatten die durch die Ablation entstandenen Partikelablagerungen auf der Glasoberfläche direkt neben der Ablationsspur keinen Einfluss auf die darauf folgenden Ablationen (Abbildung 32).

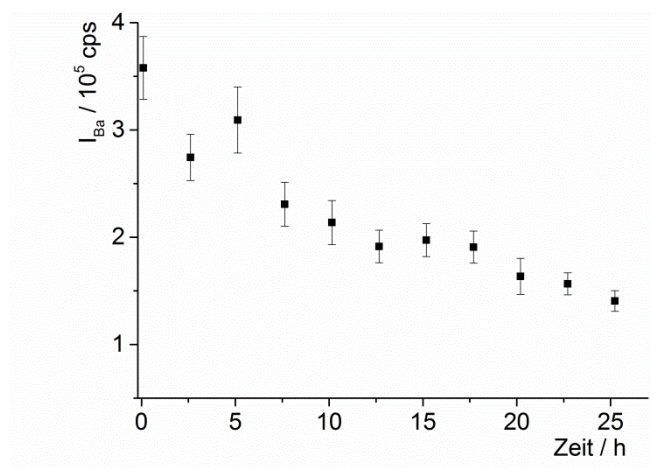


Abbildung 32: Gemittelte ^{137}Ba -Intensität der Normierungslinien mit den Standardabweichungen während der Messung des Kresseblattes (III-5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, $\mu\text{-SRXRF}$ & LA-ICP-MS); Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 7.1 mJ cm^{-2} , Laserspotgröße $50 \text{ }\mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit $50 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, Wiederholrate 20 Hz

Der Kurvenverlauf in Abbildung 32 zeigt eine starke Drift in den ^{137}Ba -Intensitäten, die vermutlich auf Gerätevariationen zurückzuführen sind. Hierbei ist der Intensitätsunterschied zwischen dem ersten und zweiten Mittelwert der ^{137}Ba Intensität der Linienscans nicht signifikant größer, als die Differenz der anderen nebeneinander liegenden Werte. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Problem der verminderten Ablation durch Ablagerungen beseitigt wurde. Dies konnte die Betrachtung der Linienscans unter dem Mikroskop bestätigen.

Da eine ausreichende Homogenität von Barium im Glasobjektträger vorhanden ist, kann dieses Element als Standard zur Korrektur von längerfristigen Gerätedriften genutzt werden. Anhand von Abbildung 32 wird deutlich, dass eine Korrektur der Messwerte der Probe durch die Normierung auf das ^{137}Ba -Signal wegen der starken Driften über einen längeren Zeitraum ($\approx 30 \text{ h}$) unbedingt notwendig ist. Angewendet wurde diese Normierung auf die Messung zur Quantifizierung des Gadoliniums im Kresseblatt (IV-4.6.2.1 Quantifizierung von Gd und Pr im Kresseblatt mittels LA-ICP-MS).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Verwendbarkeit von essentiellen Elementen wie Magnesium, Calcium und Kupfer als interner Standard aufgrund von präparativen Schwierigkeiten nicht abschließend geklärt werden konnte. Auch Cadmium ist als interner Standard für die qualitative und quantitative Untersuchung von Gadolinium in Kresse nicht geeignet, da es die Verteilung des gadoliniumbasierten Kontrastmittels verändert.

Bezüglich des Iods konnte keine homogene Verteilung im Kresseblatt festgestellt werden. Auch die weiterführenden Untersuchungen mit iodierten Gewebeschnitten waren nicht zufriedenstellend.

Die abwechselnde Ablation von Barium im Glasobjektträger und der Probe ist geeignet, um ^{137}Ba als Standard zum Ausgleich von längerfristigen Driften zu nutzen, da es homogen und in ausreichender Menge im Glas vorliegt. Diese Normierung findet bei der Messung zur Quantifizierung von Gadolinium im Kresseblatt Anwendung (siehe IV-4.6.2.1 Quantifizierung von Gd und Pr im Kresseblatt mittels LA-ICP-MS).

4.6 Untersuchungen zur matrixangepassten Kalibrierung

4.6.1 Reproduzierbarkeit

Für die Quantifizierung von Gadolinium in Kresse, das in Form gadoliniumbasierter Kontrastmittel aufgenommen wurde, soll erprobt werden, ob die Rückstände einer Reihe gadoliniumenthaltender Tropfen unterschiedlicher Konzentrationen auf unbelasteten Kresseblättern zur Kalibrierung genutzt werden können. Ein wichtiges Kriterium für die Güte des Verfahrens ist dabei die Reproduzierbarkeit der Methode. Diese soll anhand von eingetrockneten 1 μl -Tropfen mit einer Konzentration von 1 mg Gd l^{-1} – also mit einem Absolutgehalt von 1 ng Gd pro Tropfen – auf unbelasteten Kresseblättern bestimmt werden. Abbildung 33 zeigt die Intensitätsverteilungen von ^{141}Pr und ^{158}Gd in fünf Tropfen mit gleicher Konzentration auf Kresseblättern. Um bei eventuellen Interferenzen der SRXRF auf Gadolinium auf ein anderes Element ausweichen zu können, wurden die Kressepflanzen zusätzlich zum Gd-DOTA mit Pr-DOTA in der gleichen Konzentration exponiert. In den Voruntersuchungen mit der LA-ICP-MS wurde bereits gezeigt, dass sich das Praseodym ähnlich verteilt, wie das Gadolinium, was eine Grundvoraussetzung ist, um mit dem Pr den Gehalt von Gd in einem Kresseblatt abschätzen zu können.

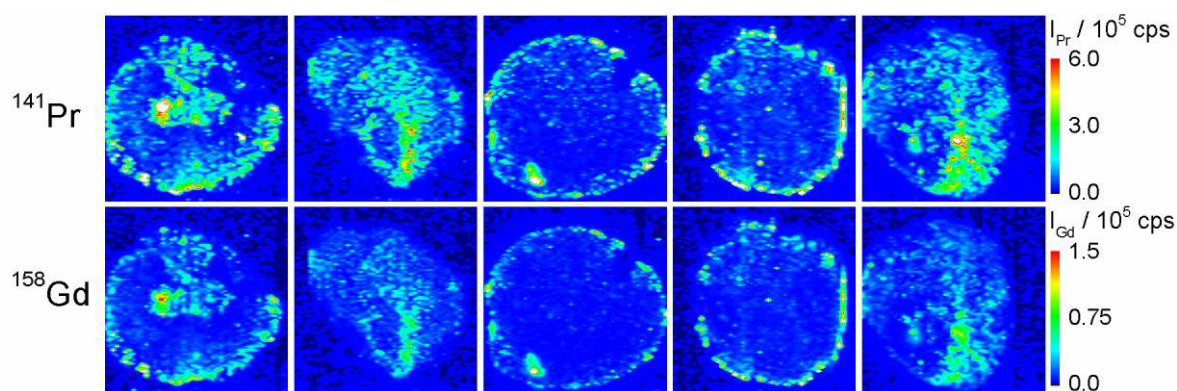


Abbildung 33: LA-ICP-MS-Intensitätsverteilungen von ^{141}Pr - und ^{158}Gd in fünf eingetrockneten $1\mu\text{l}$ Tropfen mit je $1\text{ mg Pr und Gd l}^{-1}$ Pr-DOTA- und Gd-DOTA-Lösung auf Kresseblättern fixiert auf Klebeband; Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 3.7 J cm^{-2} , Laserspotgröße $50\text{ }\mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit $30\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, Wiederholrate 20 Hz , ablatierte Fläche $2.2 \times 2.2\text{ mm}^2$

Die Tropfen weisen eine zum Teil sehr unterschiedliche örtliche Verteilung der Elemente auf, wobei die Pr und Gd im gleichen Tropfen gleich verteilt sind. Beim ersten, dritten und vierten Tropfen ist der Kaffeeringeffekt deutlich zu erkennen, wohingegen der typische äußere Ring beim zweiten und fünften Tropfen völlig fehlt und die ausgefallenen Salze eher in der Mitte der eingetrockneten Fläche konzentriert sind. Eine Vermutung ist, dass die unebene variierende Oberfläche der verschiedenen Kresseblätter maßgeblich am Trocknungsprozess beteiligt ist.

Der Mittelwert aus fünf eingetrockneten Tropfen liegt für Gadolinium bei $8.2 \cdot 10^3 \pm 1.6 \cdot 10^3\text{ cps}$ und für Praseodym bei $5.5 \cdot 10^4 \pm 9.6 \cdot 10^3\text{ cps}$. Die relativen Standardabweichungen liegen für ^{141}Pr bei 18 % und für ^{158}Gd bei 20 %, was als recht gut betrachtet werden kann, wenn man bedenkt, dass die biologische Variabilität der Dichte, der Dicke und der Zusammensetzung der inhomogenen Kresseblattmatrix sehr groß ist ($> 10\%$). Außerdem wurde mit dem sehr geringen aufgetropften Volumen von $1\text{ }\mu\text{l}$ gearbeitet – wobei die Präzision der Pipettierung bei etwa 6 % bezüglich des Tropfenvolumens lag. Die unterschiedliche Elementverteilung sollte bei der Mittelwert- bzw. Integralbildung nur einen geringen Einfluss auf die Gesamtbestimmung des jeweiligen Isotops haben.

Außer der Aussage über die Reproduzierbarkeit bietet dieses Experiment die Möglichkeit für den groben Vergleich von matrixfreien im Sinne von „kressefreien“ und matrixbelasteten Tropfen. Während sich aus der Kalibrierung für den kressefreien Tropfen für ^{158}Gd ein Mittelwert von $12\,300\text{ cps}$ errechnen lässt (siehe IV-1.1 Nachweisgrenzbestimmung mittels LA-ICP-MS), liegt der Mittelwert von ^{158}Gd mit Matrixbelastung bei

8 200 cps für die gleiche Konzentration. Die gemittelten Intensitäten sind aufgrund der täglichen Messgerätestabilität und der unterschiedlichen Tropfengröße nur bedingt vergleichbar, zeigen aber dennoch den deutlichen Trend, dass die Kressematrix das Analyt-signal unterdrückt.

4.6.2 Quantifizierung von Gd und Pr in einem Kresseblatt

Für das Experiment zur Entwicklung eines Quantifizierungskonzeptes mittels LA-ICP-MS wurden zunächst getrocknete Kresseblätter aufgeschossen, die zuvor über deren Wurzeln exponiert wurden (100 mg Gd und Pr l⁻¹ Gd-DOTA- und Pr-DOTA-Lösung, siehe III-5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, μ -SRXRF & LA-ICP-MS). Hierbei wurde das Experimentdesign geändert. Um das Verfahren reproduzierbarer zu machen, wurden die Pflanzen auf Polystyrolgranulat kultiviert, für sieben Tage zweimal täglich für zwei Stunden in die Expositionslösung getaucht und anschließend gewaschen. Da bei vorigen Experimenten die Expositionszeit ohne Unterbrechung mehrere Tage betrug, wurde hier die Konzentration von 10 mg Gd und Pr l⁻¹ auf 100 mg Gd und Pr l⁻¹ erhöht, um trotzdem aufgenommene Gd-Mengen oberhalb der Bestimmungsgrenze zu erreichen. Das Praseodym wurde als zweites Seltenerdmetall der Lösung zugefügt, um auf eventuelle Interferenzen der SRXRF auf Gadolinium auf Pr ausweichen zu können. Das Pr wurde mit dem gleichen Chelat komplexiert, dass auch das Gd im Kontrastmittelkomplex umgibt.

4.6.2.1 Quantifizierung von Gd und Pr im Kresseblatt mittels LA-ICP-MS

Zur Quantifizierung von Gadolinium und Praseodym in einem Kresseblatt wurden Kressekeimlinge sieben Tage lang täglich zweimal zwei Stunden mit 100 mg Pr und Gd l⁻¹ Pr-DOTA und Gd-DOTA exponiert.

Die mittels LA-ICP-MS erhaltenen Intensitätsverteilungen von ¹⁴¹Pr und ¹⁵⁸Gd im Kresseblatt sind in Abbildung 34 dargestellt. Die Blattadern sind sehr gut durch die lokal erhöhten Mengen an Gadolinium bzw. Praseodym zu erkennen. Die Verteilung von Praseodym und Gadolinium ist – wie in „IV-4.4 Verteilung von Pr“ gezeigt – ähnlich. Beide Elemente sind vorwiegend in den Blattadern lokalisiert. Während das Gadolinium jedoch gleichmäßig in den Blattadern des gesamten Blattes verteilt ist, nimmt die Flächenbedeckung von Praseodym in Richtung der Blattspitze in den Blattadern zu. Die Ursache

dafür können die unterschiedlichen Ionenradien der beiden Lanthanide sein. Das Gd^{3+} hat im DOTA-Komplex einen Ionenradius von 110.7 pm und das Pr^{3+} von 117.9 pm^[208, 209]. Dies hat zur Folge, dass der gesamte Komplex eine leicht veränderte Konformation annimmt, so dass der gleiche Komplex mit verschiedenen Zentralionen von der Pflanze unterschiedlich sowohl in der Menge als auch in der Verteilung aufgenommen wird. Auch die Stabilitätskonstanten der beiden DOTA-Komplexe sind etwas unterschiedlich ($\log K_{\text{Gd-DOTA}} = 24.67$ und $\log K_{\text{Pr-DOTA}} = 23.01$)^[208, 209]. Durch den vorhandenen Überschuss an Ligand sollte dies hier aber keine große Rolle spielen, da frei gewordenes Gadolinium von überschüssigem Ligand komplexiert wird und nicht Praseodym aus seinem Komplex verdrängt. Die höchsten Intensitäten des vollständig ablatierten Blattes finden sich aber sowohl beim Gadolinium als auch beim Praseodym in der Blattspitze und am vorderen Blattrand. Dorthin wurde es von der Hauptblattader in der Mitte über die kleineren Adern mit dem aufgenommenen Wasser transportiert, das dann verdunstete und das Kontrastmittel zurückließ.

In diesem Blatt konnte mittels LA-ICP-MS eine Gesamtmenge von 21 ± 17 ng Gadolinium (0.13 ± 0.11 nmol) und 39 ± 36 ng Praseodym (0.43 ± 0.40 nmol) ermittelt werden. Da die Werte über eine externe matrixangepasste Kalibrierung ermittelt wurden und nicht sichergestellt werden konnte, dass 100 % der ablatierten Partikel in das ICP-MS gelangten, sind die Ungenauigkeiten der Werte aufgrund der biologischen Variabilität erwartungsgemäß relativ groß.

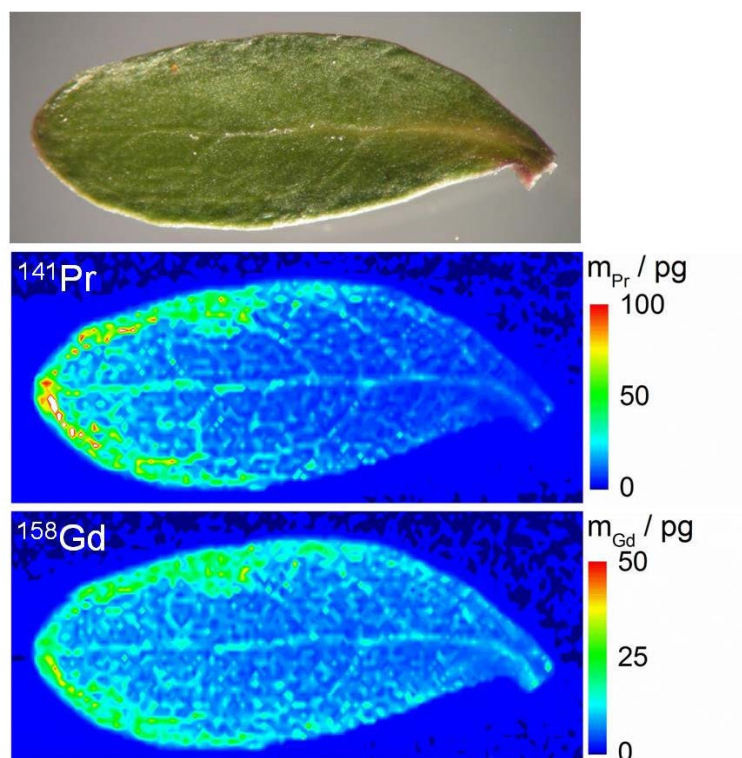


Abbildung 34: oben: Photo des untersuchten Kresseblattes (III-5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, μ -SRXRF & LA-ICP-MS), das mit 100 mg Gd l^{-1} Gd-DOTA-Lösung (Dotarem) und 100 mg Pr l^{-1} Pr-DOTA-Lösung $7 \times 2 \text{ h}$ exponiert war; mitte: LA-ICP-MS-Massenverteilungen von ^{141}Pr normiert auf ^{137}Ba ; unten: LA-ICP-MS-Massenverteilung von ^{158}Gd normiert auf ^{137}Ba (siehe IV-4.5.3); Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 7.1 J cm^{-2} , Laserspotgröße $50 \text{ }\mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit $50 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, Wiederholrate 20 Hz , Ablationsfläche $6.3 \times 2.4 \text{ mm}^2$

Das Hauptaugenmerk der Untersuchungen lag auf der Quantifizierung von Gadolinium mittels LA-ICP-MS in Kresse. Dabei wurde ein Gesamtgehalt von $21 \pm 17 \text{ ng Gd}$ in einem Kresseblatt ermittelt. Auf einen einzelnen Messpunkt bezogen, konnten so durchschnittliche Absolutmengen von $3.3 \pm 2.6 \text{ pg Gadolinium pro Pixel}$ nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Kalibriergraphen wurden die Nachweisgrenzen in einem Kresseblatt mit $4.0 \pm 2.7 \text{ ng}$ für Gadolinium abgeschätzt.

4.6.2.2 Quantifizierung von Gd und Pr im Kresseblatt mittels SRXRF

Ein Blatt derselben Kressecharge (III-5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, μ -SRXRF & LA-ICP-MS) wurde mit der SRXRF quantifiziert. Ein beispielhaftes Spektrum ist in Abbildung 35 dargestellt. Der relativ hohe Untergrund von Argon wird durch die Luft verursacht. Kalium, Calcium, Mangan, Eisen, Kupfer und Zink sind als essentielle Elemente auf die Kressematrix zurückführbar.

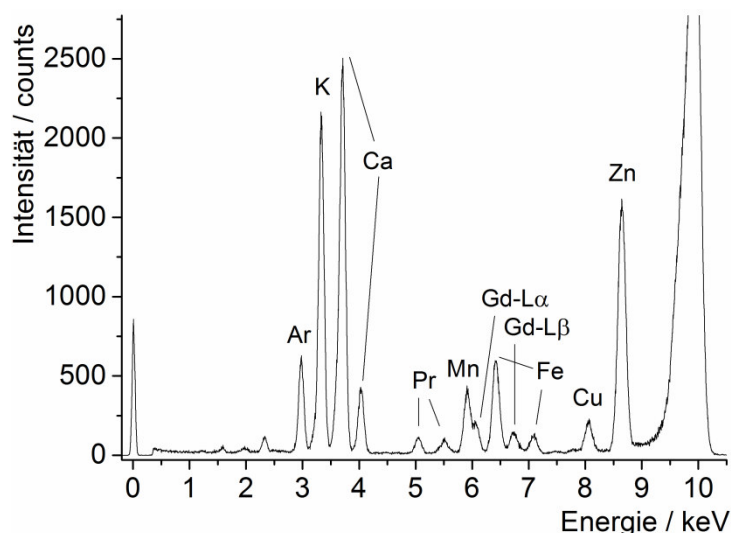


Abbildung 35: SRXRF-Spektrum eines Punktes an der Blattspitze vom untersuchten Einzelkresseblatt (III-5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, μ -SRXRF & LA-ICP-MS); Messparameter: Strahlenergie 9.9 keV, Spotgröße $30 \times 30 \mu\text{m}^2$, Messzeit 15 s Messpunkt⁻¹

Das Praseodym wurde ursprünglich als zweites Seltenerdmetall der Expositionslösung beigemischt, um bei auftretenden Interferenzen der SRXRF auf Gadolinium auf das Praseodym ausweichen zu können. Dies stellte sich im Nachhinein als nicht notwendig heraus, da die L β -Linie des Gadoliniums genutzt werden konnte, um interferenzfrei das Gadolinium mittels SRXRF zu quantifizieren. Die matrixangepasste Kalibrierung war dafür nicht notwendig.

Für die Kalibrierung wurde zunächst eine Gd-Probe als Reinstelementstandard gemessen, die für die Röntgenstrahlen der SRXRF als unendliche dicke Probe betrachtet werden kann, und damit die Zählrate für reines Gadolinium kalibriert^[210]. Daraus ergibt sich ein Faktor mit dem die erhaltenen Counts direkt in Gd-Atome bzw. -Ionen umgerechnet werden können. Die Kressematrix selbst spielt bei dieser Berechnung kaum eine Rolle, da sie zum größten Teil aus sehr leichten Elementen zusammengesetzt ist und damit die Transmission der eingestrahnten und emittierten Strahlung sehr hoch ist. Bei einer durchschnittlichen Dichte von 1.29 g cm^{-3} und einer durchschnittlichen Dicke von $46 \mu\text{m}$ (siehe III-5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, μ -SRXRF & LA-ICP-MS) wird eine Transmission von etwa 98 % erreicht. Die emittierte Fluoreszenzstrahlung wird hierbei insgesamt um maximal 12 % (berechnet mit ^[211]) abgeschwächt. Diese Schwächung wurde bei der Messung der Kresseblätter allerdings vernachlässigt, da sie keinen großen Einfluss auf das Ergebnis hatte.

Mit den gemessenen Counts aus dem untersuchten Kresseblatt wurde berechnet, wie die Flächenbelegung an Gd-Atomen aus dem Reinstelement sein müsste, um die gleiche Intensität zu erreichen. Aus diesem Wert ergibt sich ein Umrechnungsfaktor von Counts in Atome pro cm^2 . Mangels eines Praseodymreinstelementstandards wurde zur Berechnung des Umrechnungsfaktors auch die Messung der Gadoliniumfolie als Vergleichsstandard herangezogen. Dies ist für im Periodensystem der Elemente unmittelbar benachbarte Elemente zulässig. Für Praseodym beinhaltet der Umrechnungsfaktor einen Korrekturfaktor, der berücksichtigt, dass der Abstand der L-Kante von Praseodym weiter von der Strahlenergie entfernt ist und damit die Ausbeute der angeregten Atome deutlich geringer ist als bei Gadolinium. Die L-Kante ist die Mindestenergie, die nötig ist, um die L-Elektronen zur Fluoreszenz anzuregen. Da das Hauptaugenmerk auf Gadolinium lag, wurde die größere Ungenauigkeit für Praseodym in Kauf genommen.

Die Umrechnungsfaktoren wurden mit 0.909×10^{12} Counts Atome $^{-1}$ cm^2 für Gadolinium und 1.46×10^{12} Counts Atome $^{-1}$ cm^2 für Praseodym ermittelt. Die errechneten Flächenbedeckungen von Gd und Pr sind in Abbildung 36 dargestellt.

Auch hier ist der Unterschied in der Verteilung zwischen Praseodym und Gadolinium zu erkennen. Während sich das Praseodym eher im vorderen Teil Richtung Blattspitze in den Blattadern konzentriert, ist das Gadolinium gleichmäßig über das gesamte Blatt in den Adern verteilt.

Aus den Gesamtflächenbedeckungen und den molaren Massen ($140.91 \text{ g Pr mol}^{-1}$ und $157.25 \text{ g Gd mol}^{-1}$) ergeben sich für dieses Kresseblatt Gehalte von 3.5 ng Praseodym ($\triangleq 26 \text{ pmol Pr}$ bzw. $7.9 \text{ mg Pr kg}^{-1}$ bzgl. der Trockenmasse) und $7.6 \text{ ng Gadolinium}$ ($\triangleq 49 \text{ pmol Gd}$ bzw. $16.2 \text{ mg Gd kg}^{-1}$ bzgl. der Trockenmasse). Aufgrund des kreisförmigen Strahlprofils konnten die Flächenbedeckungen nicht vollständig erfasst werden. Die Gesamtgehalte von Praseodym und Gadolinium konnten aber dennoch abgeschätzt werden. Dabei kommt es aufgrund der nur leicht überlappenden Anordnung der Messpunkte zu einem Unterbefund der Analyten. In den Bereichen mit sehr geringer Intensität können die Flächenbedeckungen systematisch über- bzw. unterschätzt werden, da die Unsicherheiten größer sind, als in Bereichen höherer Intensität. Die Gehalte von Gadolinium und Praseodym liegen in der gleichen Größenordnung.

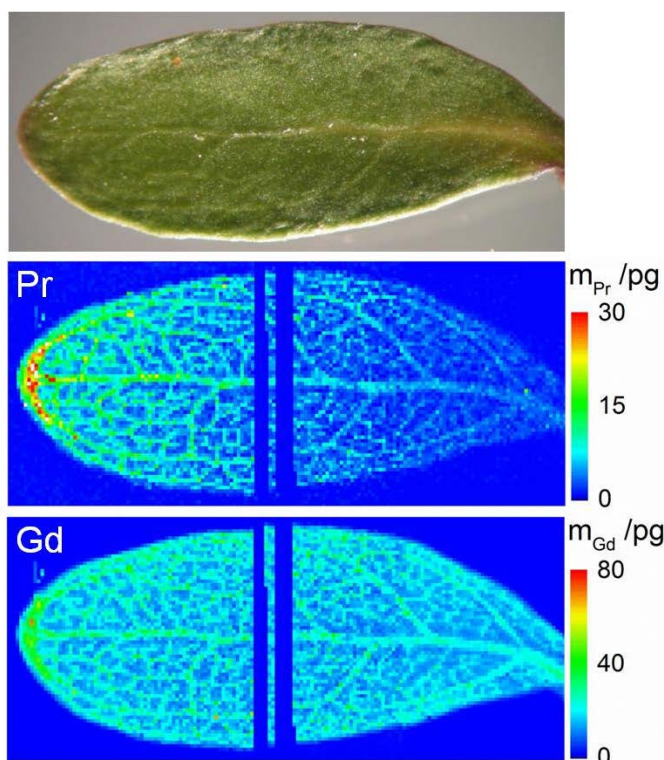


Abbildung 36: oben: Photo des untersuchten Kresseblattes (III-5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, μ -SRXRF & LA-ICP-MS); mitte: SRXRF-Intensitätsverteilungen von Pr und unten: Gd; Messparameter: eingestrahlte Strahlenergie 9.9 keV, Spotgröße $30 \times 30 \mu\text{m}^2$, Messzeit 15 s Messpunkt⁻¹; untersuchte Fläche $4.7 \times 2.0 \text{ mm}^2$ (158×69 Punkte); Die dunkelblauen Linien die mittig das Blatt kreuzen sind auf Strahlausfälle in der Nacht während der 45.5 stündigen Messung zurückzuführen.

Aus dem gadoliniumreichsten Spektrum wurden mithilfe der Formel 5 (II-2.2.2 Synchrotronstrahlung) die Nachweisgrenzen für Gd mit 5.7 ng und Pr mit 3.2 ng in einem Kresseblatt grob abgeschätzt.

4.6.2.3 Quantifizierung von Gd und Pr im Kresseblatt mittels ICP-MS

Die Ergebnisse des entwickelten Quantifizierungskonzepts von Gadolinium in einem Kresseblatt mittels LA-ICP-MS wurden mit einer unabhängigen Methode verifiziert. Um die Ergebnisse auf ihre Richtigkeit zu überprüfen, wurde die ICP-MS mit Flüssigprobeneintragssystem verwendet. Dafür wurden aus derselben Kressecharge, aus der das mittels LA-ICP-MS und SRXRF untersuchte Blatt stammt insgesamt 1350 Kresseblätter aufgeschlossen und anschließend das Gadolinium und Praseodym mittels ICP-MS über eine Kalibrierung durch Standardaddition quantifiziert. Dabei wurden die Gehalte von Pr und Gd bezüglich der Trockenmasse der Kresseblätter, sowie die gemittelten Gehalte für ein

einzelnes Kresseblatt ermittelt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ebenfalls der Biokonzentrationsfaktor nach Wild *et al.*^[212] berechnet.

Es konnten folgende Gehalte in den Kresseblättern bezogen auf die Trockenmasse ermittelt werden: $45.3 \pm 10.2 \text{ mg Pr kg}^{-1}$ (aus Pr-DOTA; $\triangleq 321 \pm 72 \text{ } \mu\text{mol Pr kg}^{-1}$) und $49.5 \pm 10.0 \text{ mg Gd kg}^{-1}$ (aus Gd-DOTA; $\triangleq 315 \pm 64 \text{ } \mu\text{mol Gd kg}^{-1}$). Diese hohen Mengen wurden in der relativ kurzen Zeit von insgesamt 14 h der Exposition aufgenommen und in die Blätter transportiert. Dabei sind die aufgenommen Mengen bezüglich der Stoffmengen von Pr und Gd innerhalb der Unsicherheiten vergleichbar. Die Aufnahmemenge ist also bei ähnlichen Ionenradien nicht vom Zentralion abhängig. Das heißt, dass die DOTA-Komplexe mit verschiedenen Zentralionen von den Wurzeln während der Aufnahme nicht unterschieden werden können. Da die Verteilung in den Blättern aber leicht unterschiedlich ist, findet vermutlich auf dem Weg der Chelate dorthin eine schwache Selektion statt.

Das gadoliniumbasierte Kontrastmittel wird mit der Nährlösung durch die Wurzeln aufgenommen und über den Stängel in die Blätter transportiert. In den Blättern verdunstet das Wasser und der Gehalt des Gadoliniums steigt.

Um die aufgenommene Menge an komplexierten Seltenerdmetallen mit der Expositionslösung vergleichen zu können, wurde der Biokonzentrationsfaktor bestimmt. Dieser berechnet sich aus dem Verhältnis vom Gehalt des Analyten bezüglich der Feuchtmasse der Probe zur Konzentration des Analyten in der Expositionslösung. In diesem Fall war der Gehalt der Analyten Pr und Gd in den untersuchten Kresseblättern signifikant geringer verglichen mit deren Konzentration in der Nährlösung (anders als in IV-4.1 Lösungsanalytik nach Aufschluss). Über die Trockenmassen und den ermittelten durchschnittlichen Wassergehalt von $88.0 \pm 0.6 \%$ in Kresseblättern wurden die Biokonzentrationsfaktoren bezüglich der Feuchtmasse mit 0.05 für Praseodym und 0.06 für Gadolinium bestimmt. Das zeigt, dass der Austausch von in den Pflanzenzellen vorhandenem Wasser und dem Kontrastmittelenthaltenden Wasser nicht vollständig war. Die Ursache dafür könnte das veränderte Experimentdesign (III-5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, μ -SRXRF & LA-ICP-MS) zugunsten einer besseren Reproduzierbarkeit des Verfahrens sein. Durch das Waschen der Wurzeln mit Wasser nach jeder Exposition konnte ein Teil des Kontrastmittels Gd-DOTA und das Pr-DOTA aus den Pflanzen heraus diffundieren, sodass der Biokonzentrationsfaktor deutlich geringer ist. Die Kontrastmittelaufnahme ergab wegen der zehnfach höheren Konzentra-

tion an Kontrastmittel (Gd-DOTA) und Pr-DOTA in der Expositionslösung (100 mg Gd l^{-1} statt 10 mg Gd l^{-1}) trotzdem gut messbare Intensitäten mit den drei verwendeten Methoden ICP-MS, SRXRF und LA-ICP-MS.

Pro Kresseblatt mit einer durchschnittlichen Trockenmasse von $340 \mu\text{g}$ konnten mittels ICP-MS $15.3 \pm 3.4 \text{ ng}$ aufgenommenes Praseodym und $16.7 \pm 3.4 \text{ ng}$ aufgenommenes Gadolinium bestimmt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass erstmals die Quantifizierung von Gadolinium und Praseodym aus einem gadoliniumbasierten Kontrastmittel Gd-DOTA und Pr-DOTA in einem Kresseblatt mittels LA-ICP-MS gelang. Der Gesamtgehalt konnte sowohl mittels SRXRF als auch mittels ICP-MS nach Aufschluss innerhalb der gleichen Größenordnung bestätigt werden (Tabelle 16). Das Ergebnis der ICP-MS-Messung der wässrigen Probe nach Aufschluss von 1350 Kresseblättern überschneidet sich sogar innerhalb der Fehlergrenzen mit dem Gesamtgehalt an Gadolinium – wie auch Praseodym –, der in dem einzelnen Blatt mittels LA-ICP-MS bestimmt wurde. Angesichts der biologischen Variabilität ist eine solche Übereinstimmung überraschend.

Tabelle 16: Übersicht über die mit den drei verwendeten Methoden bestimmten Gehalte von Pr und Gd in einem Kresseblatt

	Gadolinium [ng]	Praseodym [ng]	Absolutmenge Gd pro Pixel [pg]
ICP-MS nach Aufschluss	16.7 ± 3.4	15.3 ± 3.4	
SRXRF	7.6	3.7	0.7
LA-ICP-MS	21 ± 17	39 ± 36	3.3 ± 2.6

Erwartungsgemäß wurden die mittels SRXRF bestimmten Gehalte von Praseodym und Gadolinium etwas unterschätzt. Trotz des runden Strahlprofils mit dem die Flächenbedeckungen nur abgeschätzt werden können, liegen diese nah bei den Gd-Gehalten, die mit der LA-ICP-MS und mit der ICP-MS bestimmt wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass das für die LA-ICP-MS entwickelte Quantifizierungskonzept anwendbar ist. Die LA-ICP-MS und auch die SRXRF sind gut geeignet, um neben der Elementverteilung auch den Elementgehalt von Gadolinium und Praseodym in einem Kresseblatt zu bestimmen. Die matrixangepasste Kalibrierung der LA-ICP-MS gelang über die Messung der Rückstände von eingetrockneten Elementstandardtropfen. Im Kresse-

blatt konnten dabei durchschnittliche Gehalte von 3.3 pg Gd pro Pixel mit der LA-ICP-MS und mit der SRXRF sogar 0.7 pg Gd pro Pixel nachgewiesen werden.

5. Aquatische Fauna - Wasserflöhe

Die Aufnahme und Verteilung von gadoliniumbasierten Kontrastmitteln in biologischen Systemen wurde bereits an verschiedenen Vertretern der aquatischen Flora (Algen, Wasserlinsen) und einer Landpflanze (Kresse) gezeigt. Nun soll zusätzlich an einem komplexeren tierischen Modellorganismus, dem Wasserfloh (im Folgenden Daphnie genannt), die Aufnahme und Verteilung der gadoliniumbasierten Kontrastmittel untersucht werden, da hier andere Aufnahme- und Transportmechanismen vorhanden sind.

Daphnien sind wichtige Biomonitore, weil sie gelöste und feste Kontaminanten durch ihre Kiemen und das Verdauungssystem aufnehmen können^[213]. Folglich können Daphnien gadoliniumhaltige Kontrastmittel direkt aus dem Wasser oder auch über Nahrung, die Kontrastmittel enthält, aufnehmen.

5.1 Aufnahme und Verteilung von Gd-basiertem Kontrastmittel aus dem umgebenden Medium

Wie auch bei den Wasserlinsen wurden die Konzentrationen des Kontrastmittels (100 mg Gd l⁻¹ Gd-DTPA-Lösung) so hoch gewählt, dass innerhalb der kurzen Expositionsdauer von 19 Stunden mit der LA-ICP-MS eindeutige Signale außerhalb des Rauschens erreicht werden konnten.

Durch die vollständige Ablation der Daphnie wird ein zweidimensionales Verteilungsbild erzeugt, das die Tiefeninformationen überlagert darstellt. Mit Hilfe eines internen Standards für die LA-ICP-MS könnten unterschiedliche Gewebedicken bzw. -dichten ausgeglichen werden. Untersuchungen dazu sind in „IV-4.5 Standard zum Ausgleich von Variationen des Messsignals“ gezeigt. Eine Daphnie ist jedoch so komplex aufgebaut, dass es unmöglich scheint einen einzigen Standard zu finden, der für den gesamten Organismus zum Ausgleich der variierenden Gewebe geeignet ist. Eine elegante und einfache Lösung dieses Problems zur Aufklärung der Tiefeninformation ist die Messung derselben Daphnie mit der dreidimensionalen μ -Computertomographie (siehe IV-5.1.2 Untersuchung zur Aufnahme von Gd aus dem umgebenden Medium mittels 3D μ -CT) – einer zerstörungsfreien Methode und der anschließenden LA-ICP-MS. Zunächst sollen die Ergebnisse der LA-ICP-MS vorgestellt werden.

5.1.1 Untersuchung zur Aufnahme von Gd aus dem umgebenden Medium mittels LA-ICP-MS

Daphnien nehmen alle für sie notwendigen Nährstoffe über das umgebende Wasser bzw. die darin befindlichen einzelligen Algen auf. Der Aufbau einer Daphnie mit der Benennung der Körperteile ist in „II-3.4 Aquatische Fauna – Wasserfloh – *Daphnia magna*“ erklärt.

Zunächst wird die Aufnahme des gadoliniumbasierten Kontrastmittels aus dem umgebenden Nährmedium betrachtet. Durch die Filtration der Nahrung aus dem Kultiviermedium und auch die Atmung über die Haut und die Kiemen wird eine Aufnahme über die Haut aber auch über das Verdauungssystem erwartet. Die ^{158}Gd -Intensitätsverteilung und ein Photo der exponierten Daphnie sind in Abbildung 37 dargestellt. Die Gd-Intensitäten im Körper der Daphnie sind gut vom Untergrund unterscheidbar. Erhöhte Gd-Intensitäten finden sich im gesamten Körper der Daphnie wieder. Am stärksten sind die Signale im Bereich des Kopfes und des Darms (siehe Abbildung 37 und Abbildung 15).

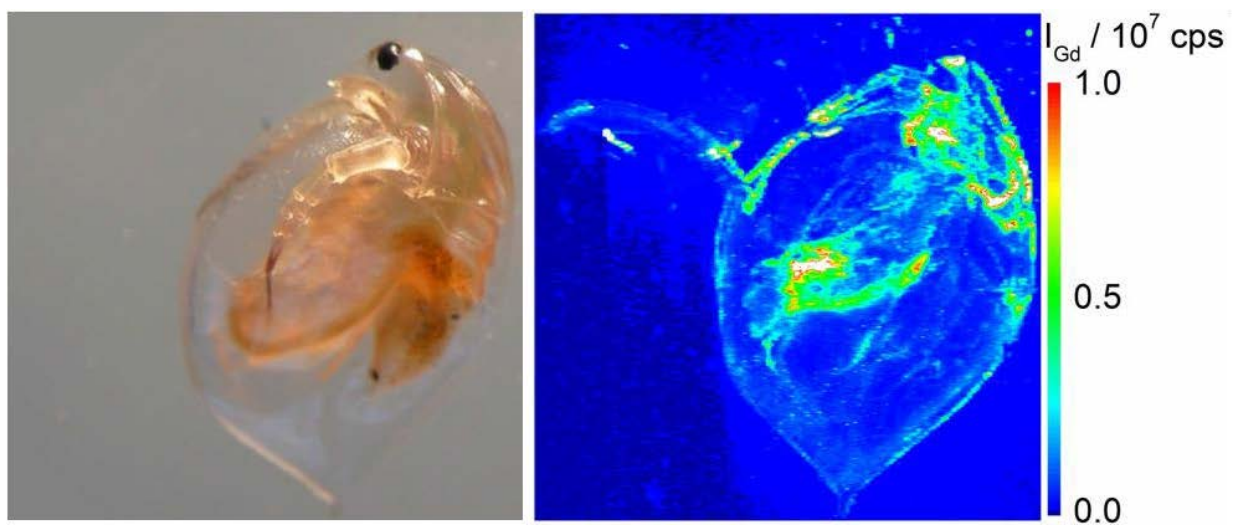


Abbildung 37: links: Lichtmikroskopaufnahme; rechts: mittels LA-ICP-MS gemessene Intensitäten von ^{158}Gd in Daphnie 1 (19 h in 100 mg Gd l^{-1} Gd-DTPA-Lösung); Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 1.9 J cm^{-2} , Laserspotgröße $30 \mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit $15 \mu\text{m s}^{-1}$, Wiederholrate 20 Hz , ablatierte Fläche: $3.5 \times 3.2 \text{ mm}^2$; Dieselbe Probe wurde zunächst mit der $\mu\text{-CT}$ untersucht. Da der dort verwendete Probenträger für die LA-ICP-MS nicht geeignet war, musste die Probe umgelagert werden. Dabei ist die linke Antenne 2 abgebrochen, die im linken oberen Bereich des LA-ICP-MS-Intensitätsverteilungsbildes liegt.

Die Daphnie könnte also das Gd sowohl über das Verdauungssystem als auch durch den direkten Kontakt mit dem Kontrastmittel aus der Nährlösung über die Haut und die Kie-

men aufgenommen haben. Das Gd kann demzufolge auch über Fische, die sich von exponierten Daphnien ernähren, in die menschliche Nahrungskette gelangen.

Die LA-ICP-MS-Messungen ergeben zweidimensionale Elementverteilungen, in denen die Tiefeninformationen überlagert sind. In dem Fall der untersuchten Daphnie sind die hohen Intensitäten nicht eindeutig lokalisierbar. Die wichtige Frage, ob sich das Kontrastmittel innerhalb oder außerhalb der Daphnie – also auf der Haut – befindet, kann mittels dreidimensionaler μ -Computertomographie (siehe IV-5.1.2 Untersuchung zur Aufnahme von Gd aus dem umgebenden Medium mittels 3D μ -CT) aufgeklärt werden. Befindet sich das Kontrastmittel innerhalb der Daphnie, kann es möglicherweise angereichert werden und so über Fische in die menschliche Nahrungskette gelangen.

Da die μ -CT im Vergleich zur LA-ICP-MS eine zerstörungsfreie Analysemethode ist, wurde dieselbe Probe zuerst mittels μ -CT und im Anschluss mit der LA-ICP-MS untersucht.

5.1.2 Untersuchung zur Aufnahme von Gd aus dem umgebenden Medium mittels 3D μ -CT

Zur Unterstützung der LA-ICP-MS und Erweiterung der zweidimensionalen Ergebnisse der ^{158}Gd -Verteilung in einer Daphnie, die über das Nähmedium exponiert wurde, wurde die dreidimensionale μ -Computertomographie eingesetzt. Damit soll nun geklärt werden, ob die Daphnie das Kontrastmittel in sich aufgenommen hat, oder es sich eher auf der Oberfläche der Haut befindet. Dazu wird die Gesamtaborption der Röntgenstrahlung durch den Körper gemessen. Durch die Drehung des Körpers und die Messung in verschiedenen Winkeln kann die dreidimensionale Schwächung der Strahlung berechnet werden. Die CT ist keine elementspezifische Methode, so dass zusätzlich eine unbelastete Daphnie analysiert werden musste. Da die beiden Organismen nicht identisch sind, können die Spektren nicht voneinander subtrahiert, wohl aber verglichen werden.

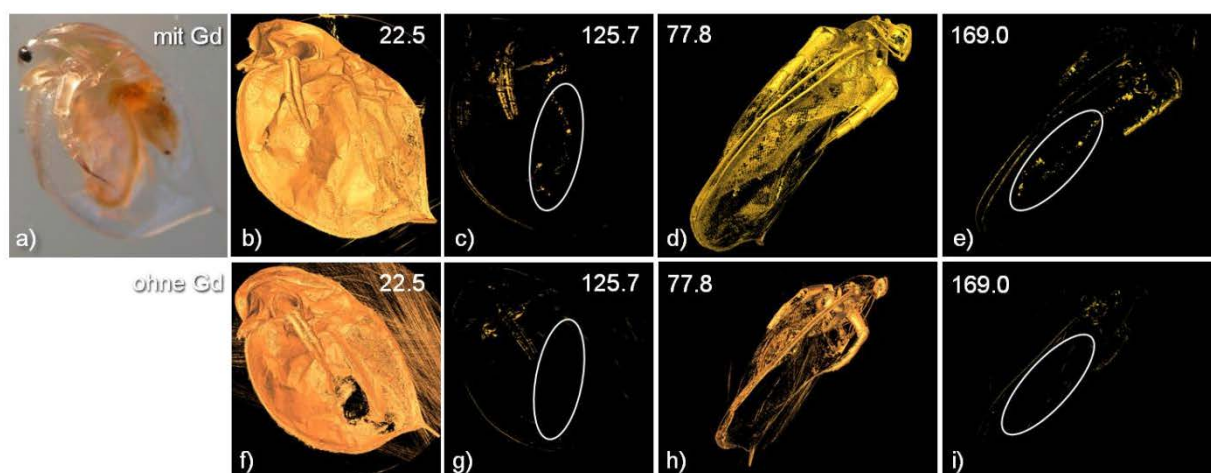


Abbildung 38: a) Lichtmikroskopaufnahme der belasteten Daphnie (19 h in 100 mg Gd l^{-1} Gd-DTPA-Lösung), b) bis e) zweidimensionale Seiten- und seitliche Frontansicht mit je zwei Grauwertspreizungen der Schwächungskoeffizienten in der belasteten Daphnie ermittelt mit der dreidimensionalen μ -CT; f) bis i) zweidimensionale Seiten- und seitliche Frontansicht der Schwächungskoeffizienten in der unbelasteten Daphnie ermittelt mit der dreidimensionalen μ -CT. Die oberen Grauwertspreizungen in den Ecken der Bilder stellen verschiedene Kontraste dar. Dabei steht ein höherer Wert für einen höheren Kontrast. Die weißen Ellipsen umranden den Bereich des Darms der beiden Daphnien.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Daphnie mittels LA-ICP-MS wurden bereits in „IV-5.1.1 Untersuchung zur Aufnahme von Gd aus dem umgebenden Medium mittels LA-ICP-MS“ vorgestellt. Die ^{158}Gd -Intensitätsverteilung zeigte erhöhte Intensitäten im Bereich des Kopfes und des Darms.

Die Computertomographie ermöglicht eine dreidimensionale Darstellung der erhaltenen Schwächung der Röntgenstrahlung. Da diese nur mithilfe eines speziellen Computerprogramms betrachtet werden können, wurden für die Darstellung in dieser Arbeit je zwei zweidimensionale Ausschnitte gewählt, die die Tiefeninformationen überlagert darstellen. Zum Vergleich der belasteten und der unbelasteten Daphnie wurden beide Daphnien in die gleichen Positionen gedreht und diese in Abbildung 38 dargestellt. Diese können nun Hinweise darauf geben, ob das Gadolinium tatsächlich lokal angereichert ist und wo es sich befindet.

Die bei der Röntgentomographie erhaltenen Informationen sind Schwächungskoeffizienten, die durch die Gesamtschwächung der Röntgenstrahlung durch Absorption aller im Strahl vorhandener Elemente entstehen (siehe II-2.3 Dreidimensionale μ -Computertomographie). Durch verschiedene Kontraste werden unterschiedliche starke Schwächungen des Röntgenstrahls sichtbar. Beide Daphnien sind normiert, so dass ihre Grauwertspreizungen ($\hat{=}$ Kontrast) vergleichbar sind. Bei der kontrastärmeren Dar-

stellung der Daphnien mit einer oberen Grauwertspreizung von 22.5 bzw. 77.8 ist die komplette Oberfläche der Daphnien sehr gut erkennbar, da auch geringe Absorptionen hell dargestellt werden. Bei dem höheren Wert von 125.7 bzw. 169.0 sind nur noch Bereiche mit einer starken Absorption durch schwere Elemente sichtbar. Zusätzlich zur Seitenansicht sind von beiden Daphnien Darstellungen in der seitlichen Frontansicht gezeigt.

Der Vergleich der beiden Daphnien zeigt, dass bei höheren Grauwertspreizungen in der exponierten Daphnie der Darm mit einzelnen Hotspots gut erkennbar ist (Bereiche innerhalb der weißen Ellipsen in Abbildung 38c), e), g) und i)), während dieser bei der nicht exponierten Daphnie nicht zu sehen ist. Durch die Dreidimensionalität der Messung bzw. die Darstellung der Ergebnisse in zwei verschiedenen Ansichten ist der genaue Ort der Hotspots besonders gut im Darm lokalisierbar. Im Darm befinden sich bei der exponierten Daphnie also ein oder mehrere schwere Elemente, welche eine stärkere Absorption verursachen als die Elemente, die sich auf der Körperoberfläche befinden. Dadurch wird der Darm durch Erhöhung des Kontrastes bei der exponierten Daphnie deutlich erkennbar. Da bei der unbelasteten Daphnie der Darm nicht erkennbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem schweren Element, das diese starken Absorptionen verursacht, um Gadolinium handelt. Auch im Bereich der Antennen sind Unterschiede erkennbar. Die Daphnie, die dem gadoliniumhaltigen Kontrastmittel ausgesetzt war, ist in diesem Bereich etwas heller, hat also aufgrund schwererer Elemente an diesen Stellen mehr Röntgenstrahlung absorbiert.

Die gemessenen Schwächungskoeffizienten während der Röntgentomographie sind auf zwei in dieser Messung nicht unterscheidbare Effekte zurückführbar. Der gewünschte Effekt ist die Absorption der Röntgenstrahlung durch schwere Elemente. Durch Interferenzen kann aber der sogenannte Kantenüberhöhungseffekt entstehen (II-2.3 Dreidimensionale μ -Computertomographie). Da dieser aber auf wenige Pixel begrenzt ist, kann bei starken Schwächungskoeffizienten von einer tatsächlichen Absorption ausgegangen werden.

Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass die Absorption der Röntgenstrahlung durch schwere Elemente im Darm der mit Gd-Kontrastmittel belasteten Daphnie wesentlich größer ist, als die Absorption der Röntgenstrahlung im Darm der unbelasteten Daphnie. Durch den Vergleich der beiden Daphnien und die Kombination der dreidimensionalen μ -CT und der LA-ICP-MS-Analyse (IV-5.1.1 Untersuchung zur Aufnahme von Gd aus dem umgebenden Medium mittels LA-ICP-MS) im Anschluss daran kann geschluss-

folgert werden, dass es sich bei dem schweren Element um Gadolinium handelt. Dieses wurde also neben Ablagerungen auf der Oberfläche der Haut von der Daphnie während der Exposition in der kontrastmittelhaltigen Lösung in den Darm aufgenommen.

5.2 Aufnahme von Kontrastmitteln über die Nahrung

In Kapitel „III-5.1 Aufnahme und Verteilung von Gd-basiertem Kontrastmittel aus dem umgebenden Medium“ wurde die Aufnahme eines MRT-Kontrastmittels durch eine Daphnie über das Nährmedium betrachtet. Dabei konnte das Kontrastmittel sowohl über die Haut als Atmungsorgan als auch über die Verdauungswege aufgenommen werden. Nun soll die Aufnahme allein über die Nahrung untersucht werden. Dazu wurden die Daphnien mit einzelligen Schwebalgen (*Scenedesmus subspicatus*) versorgt, die in einer kontrastmittelhaltigen Nährlösung kultiviert wurden (siehe III-3.2 Zuchtmedium für Algen). In „IV-2. Wasserpflanzen – Fadenalgen“ wurde die Adsorption von Kontrastmittel an Fadenalgen gezeigt. Da das Kontrastmittel in einer gadoliniumfreien Nährlösung aber auch wieder von den Algen desorbieren kann, wurde die Daphnie über einen relativ kurzen Zeitraum von 19 Stunden exponiert.

Abbildung 39 zeigt ein Photo und die Intensitätsverteilung von ^{158}Gd in einer Daphnie die über die Nahrung exponiert wurde. Die höchsten Intensitäten von Gadolinium finden sich im Bereich des Darms. Sie sind etwa um einen Faktor von 50-300 höher als im restlichen Gewebe. Bei der Daphnie, die durch ein Gd-haltiges Nährmedium exponiert wurde, beträgt der Unterschied zwischen der Gd-Intensität im Darm und im restlichen Gewebe nur etwa einen Faktor von 15-30. Damit ist der Kontrast im Fall der durch die Nahrung exponierten Daphnie wesentlich stärker als in der Daphnie, die mit Gd über das Kultiviermedium exponiert wurde. Dadurch kann auch gezeigt werden, dass das Gd im Experiment mit Gd in der Nährlösung tatsächlich über die Haut aufgenommen werden kann, bzw. adsorbiert wird und nicht über den Aufnahmeweg des Verdauungsapparats in der Haut abgelagert wird.

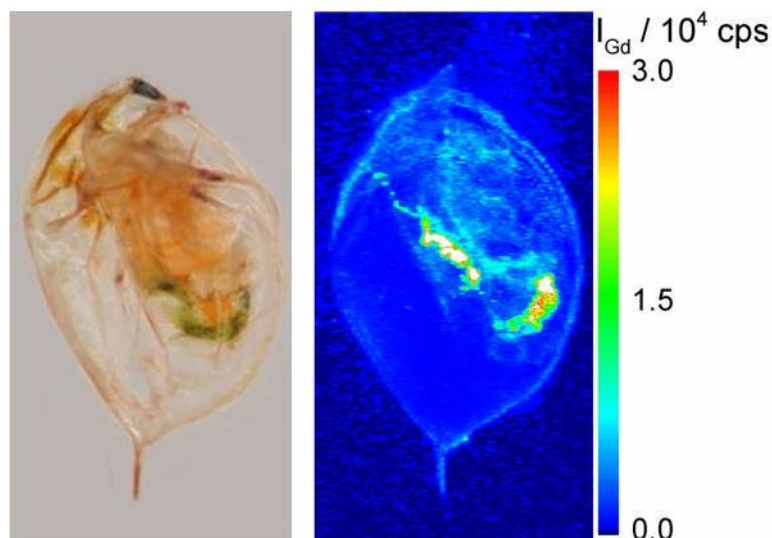


Abbildung 39: Lichtmikroskopaufnahme einer Daphnie & LA-ICP-MS-Intensitätsverteilung von ^{158}Gd in einer Daphnie (19 h mit 28 mg Gd l^{-1} Gd-DTPA-Lösung enthaltenden Algen); Ablationsparameter: Bestrahlungsstärke 1.8 J cm^{-2} , Laserspotgröße $30 \text{ }\mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit $15 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$, Wiederholrate 20 Hz , ablatierte Fläche $1.9 \times 3.3 \text{ mm}^2$

Das mit der Nahrung aufgenommene Gd hat sich innerhalb des Zeitraums der Exposition nicht im gesamten Körper der Daphnie verteilt. Dieses Experiment zeigt daher erstmalig, das Gd mit den einzelligen Futteralgen für mindestens 19 Stunden auch nach der Aufnahme durch die Daphnie verbunden bleibt. Außerdem wird es nicht in dieser Zeit vom Kultiviermedium herunter gewaschen. Aus den signifikant höheren Gd-Signalen im Darm kann geschlussfolgert werden, dass eine Aufnahme über die Nahrung möglich ist. Damit wurde erneut gezeigt, dass gadoliniumbasierte Kontrastmittel die Nahrungskette höherer Organismen erreichen können. Algen sind ein wichtiger Nährstofflieferant für Muscheln, während Daphnien die Hauptnahrung einiger Fischarten sind. In beiden Fällen besteht ein erhöhtes Risiko, das die Kontrastmittel die Nahrungskette von Menschen erreichen. Wenn diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind, ist jeder täglich geringen Gd-Dosen – die aber deutlich höher als die natürlichen Gd-Dosen sind – über den Wasserkonsum und die Nahrung ausgesetzt.

V ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK

Gadoliniumbasierte Komplexe reichern sich seit ihrer Verwendung als MRT-Kontrastmittel in den 1980er Jahren in Oberflächengewässern an. Das Verhalten des Gadoliniums in der Umwelt, die Wechselwirkung mit dort lebenden Organismen und die Bildung von Metaboliten sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Aufgrund der Toxizität des freien Gd^{3+} -Ions ist es wichtig den Weg des Gadoliniums in der Umwelt zu verfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Aufnahme und Verteilung von Kontrastmitteln in vier verschiedenen Modellorganismen mit vier unterschiedlichen Methoden untersucht. Drei dieser Methoden – die Röntgenfluoreszenzanalyse mit Synchrotronstrahlung (SRXRF), die dreidimensionale μ -Computertomographie (3D μ -CT) und die Laserablation mit der induktiv gekoppelten Plasmamassenspektrometrie (LA-ICP-MS) – sind auf die bildgebende Darstellung spezialisiert. Die ICP-MS mit Flüssigprobeneintragssystem wurde für die Gesamtbestimmung des Gadoliniumgehaltes in aufgeschlossenen Modellorganismen genutzt. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der bildgebenden Untersuchung der Gadoliniumverteilung in Modellorganismen mit der LA-ICP-MS, der Findung und Anwendung eines Standards zum Ausgleich von Messsignalvariationen, sowie der Entwicklung und Erprobung eines Quantifizierungskonzepts für Gadolinium in einem ausgewählten Organismus, das mit der SRXRF und ICP-MS nach einem Aufschluss verifiziert werden sollte.

Die Nachweisgrenzen von ^{25}Mg , ^{44}Ca , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{114}Cd , ^{141}Pr und ^{158}Gd wurden mit der LA-ICP-MS und von La, Pr, Eu, Gd, Ho, Er und Yb mit der SRXRF durch die Kalibrierung über eingetrocknete Multielementstandardtropfen unter jeweils optimierten Bedingungen bestimmt. Die Nachweisgrenzen bezogen auf den Tropfen lagen mit der LA-ICP-MS zwischen 0.11 pg (Pr) und 810 pg (Ca). Mit der SRXRF konnten Nachweisgrenzen zwischen 41 pg (Er) und 179 pg (Ho) bezüglich eines 1 μ l Tropfens bestimmt werden. Gadolinium kann unter den gewählten Bedingungen mit der LA-ICP-MS (0.78 pg) um mehr als zwei Größenordnungen (~ 114 fach) empfindlicher nachgewiesen werden als mittels SRXRF (89 pg).

Zur Untersuchung der Aufnahme eines Kontrastmittels wurde zunächst eine einfache, gut handhabbare Wasserpflanze, die Fadenalge (*Zygnema*) gewählt. Es konnte gezeigt werden, dass Fadenalgen das gadoliniumbasierte Kontrastmittel ab- bzw. adsorbieren und anschließend in einer kontrastmittelfreien Lösung auch wieder desorbieren können.

Die Untersuchungen zur zeitabhängigen und konzentrationsabhängigen Aufnahme der Kontrastmittel fanden an Schwimmpflanzen, speziell Wasserlinsen (*Lemna minor*), statt. Der Verdacht der diffusionsgetriebenen Aufnahme der Kontrastmittel konnte durch die Ergebnisse bestärkt werden, denn die Aufnahme erfolgte konzentrationsabhängig und innerhalb eines Zeitraums von einem bis sieben Tagen der Exposition zeitunabhängig.

Um die direkte Adsorption der Kontrastmittel an den Wasser- und Schwimmpflanzen zu umgehen, wurden Landpflanzen (Gartenkresse, *Lepidium sativum*) exponiert und hinsichtlich der Verteilung von Gadolinium untersucht. In allen Hauptkompartimenten der Kresse (Blätter, Stängel, Wurzel) wurde nach dem Aufschluss mit der ICP-MS Gadolinium nachgewiesen. Der Gd-Gehalt war dabei in den Blättern fünf- bzw. zehnmal höher als in den Wurzeln bzw. Stängeln. Da das Schutzsystem von Landpflanzen – der Casparische Streifen und die Selektion in den Endodermiszellen – in jungen Pflanzen, wie den untersuchten Kressekeimlingen noch nicht vollständig ausgebildet ist, konnte das Kontrastmittel mit dem aufgenommenem Wasser in die Pflanze eindringen.

Anhand der LA-ICP-MS-Intensitätsverteilungen einer Kressepflanze wurde gezeigt, dass sich das Gadolinium im Blatt vorwiegend entlang der Blattadern und in der Blattspitze verteilt. Der Stängel zeigt lokale Erhöhungen der Intensität im mittleren Drittel, wo sich der Zentralzylinder befindet, der das Wasser zu den Blättern transportiert. Die Gd-Verteilung in den Wurzeln erscheint nahezu homogen. Mittels SRXRF konnte die Lokalisierung des Gadoliniums in den Blattadern bestätigt werden.

Dass nicht alle im Nährmedium enthaltenen Elemente von der Kresse in gleicher Weise aufgenommen und verteilt werden, konnte anhand von Cadmium gezeigt werden, von dem bekannt ist, dass es an Pflanzenproteine bindet. Das aufgenommene Cadmium verteilt sich nicht nur anders, es bewirkt sogar eine leichte Veränderung der Verteilung von Gadolinium, das hier gleichmäßiger im Kresseblatt und nicht vorwiegend in den Blattadern verteilt war. In weiteren Experimenten könnte untersucht werden, ob das Cadmium auch auf die aufgenommene Menge an Kontrastmittel einen Einfluss hat, oder ob es auch andere Ionen gibt, die die Gd-Aufnahme beeinflussen.

Auch die Verteilung von dem mit einem Kontrastmittelchelat versehenen Praseodym Pr-DOTA unterscheidet sich leicht von der Verteilung des analogen Gd-Chelates Gd-DOTA, vermutlich aufgrund verschiedener Ionengrößen.

Als Standard zum Ausgleich von Variationen des Messsignals wurden essentielle, in der Pflanze bereits vorhandene Elemente, sowie künstlich eingebrachte Elemente, wie Iod und ^{137}Ba im Glasobjektträger getestet. Die Eignung der essentiellen Elemente als Standard konnte aufgrund der Veränderung der Gd-Verteilung während der Präparation von Gewebeschnitten nicht abschließend geklärt werden, wobei sich ^{63}Cu als aussichtsreichstes Isotop darstellte. Iod ist als interner Standard hier ebenfalls nicht geeignet, da durch die Iodierung ebenfalls die Gd-Verteilung verändert wird. Die Resublimation von Iod auf der Kresse führte zu starken Memoryeffekten. Da gezeigt wurde, dass ^{137}Ba homogen im Objektträger verteilt ist, wurde dieses Isotop nach der Optimierung der Messparameter zum Ausgleich von Gerätedriften verwendet.

Die Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der LA-ICP-MS-Messung von ^{158}Gd und ^{141}Pr in eingetrockneten Tropfen unter dem Matrixeinfluss von Kresseblättern ergab eine relative Standardabweichung von 18 % für ^{141}Pr und 20 % für ^{158}Gd . Die Matrix verringert dabei das Signal um einen Faktor von $1/3$.

Die Quantifizierung von Gd im Kresseblatt mittels LA-ICP-MS wurde durch eine externe matrixangepasste Kalibrierung über eingetrocknete Elementstandardtropfen auf unbelasteten Kresseblättern realisiert. Im untersuchten Blatt wurden mittels LA-ICP-MS 21 ± 17 ng Gadolinium bestimmt. Diese Werte konnten sowohl mit der ICP-MS nach einem Aufschluss von Kresseblättern derselben Charge innerhalb der Unsicherheiten als auch mit der SRXRF in der gleichen Größenordnung bestätigt werden. Mit der ICP-MS wurde nach einem Aufschluss ein mittlerer Gehalt von 16.7 ± 3.4 ng Gd pro Kresseblatt ermittelt. Mit der SRXRF wurde der Gehalt von Gadolinium wegen der Strahlform etwas unterschätzt (7.6 ng Gd im untersuchten Blatt). Er liegt aber dennoch nah bei den mit der ICP-MS nach Aufschluss und mit der LA-ICP-MS bestimmten Gehalten. Das entwickelte Quantifizierungskonzept ist somit auf Gadolinium in Kresse anwendbar.

Zur Untersuchung verschiedener Aufnahmewege von Gd durch aquatische Tiere wurden Wasserflöhe (*Daphnia magna*) gewählt. Die LA-ICP-MS-Messung nach der Aufnahme von Gd über das Kultiviermedium zeigte, dass das Gadolinium vorwiegend im Bereich des Darms und auf der Haut im Bereich des Kopfes lokalisiert ist. Durch die Messung derselben Daphnie mit der 3D μ -CT konnte dies bestätigt werden. Die Exposition einer Daphnie über gadoliniumhaltige Futteralgen dagegen zeigte signifikant höhere Gd-Intensitäten im Darm der Daphnie in einen größeren Kontrast zum umliegenden Gewebe. Das zeigt zum einen, dass das Kontrastmittel innerhalb von 19 Stunden an den Algen adsorbiert bleibt

und zum anderen, dass die Kontrastmittel mit der Nahrung aufgenommen und mindestens kurzfristig gespeichert werden können, so dass diese über die Daphnien als Fischnahrung in die menschliche Nahrungskette gelangen können. Die Ergebnisse sollten an weiteren im Wasser und an Land lebenden Organismen verifiziert werden.

Alle Experimente zeigen, dass Gd von Pflanzen und Tieren aufgenommen werden können. In vielen Oberflächengewässern und teilweise auch im Grund- und Leitungswasser ist Gd in erhöhter Konzentration im Vergleich zu den anderen Seltenerdmetallen vorhanden (positive Gd-Anomalie). Daraus kann geschlossen werden, dass Pflanzen und Tiere, die in diesem Wasser leben, permanent höheren Dosen anthropogenen Gadoliniums aus Kontrastmitteln ausgesetzt sind. Aber auch die mit diesem kontaminierten Wasser bewässerten Felder und getränkten Tiere sind betroffen. Von dort ist es nur ein kurzer Weg zur menschlichen Nahrungskette. Aufgrund der steigenden Gd-Konzentration im Wasser sollten die Konsequenzen der Aufnahme durch verschiedene Organismen und eine mögliche Metabolisierung nicht unterschätzt werden. Momentan ist unbekannt, ob dies zu Risiken für lebende Systeme führen kann. Wegen der hohen Persistenz der Kontrastmittel in Wasser ist jedoch ein Monitoringsystem nötig, um die zukünftigen Entwicklungen zu überwachen. Prophylaktisch ist die Verbesserung der Wasseraufbereitung in Kläranlagen sinnvoll.

VI ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Strukturen einiger verwendeter gadoliniumbasierter Kontrastmittel ^[50] und des häufigen Gegenions Meglumin	20
Abbildung 2: links: Gehalte der Seltenerdmetalle in filtriertem Flusswasser (Västerdalälven - Schweden, Toshibetsu - Japan, Elbe, Mosel, Rhein) mitte: Gehalte der Seltenerdmetalle in filtriertem Flusswasser (Havel, Spree, Wupper); rechts: Gehalte der Seltenerdmetalle in filtriertem Leitungswasser aus Berlin-Steglitz und in filtriertem Klärwerksabfluss aus Berlin-Ruhleben ^[16]	25
Abbildung 3: Schematische Darstellung der grundlegenden Bauteile eines ICP-SFMS	31
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines konzentrischen Zerstäubers.....	38
Abbildung 5: Photos der Scott- ^[119] und der Zyklon ^[120] -Sprühkammer	39
Abbildung 6: Grundlegender Aufbau eines Nd:YAG-Lasers	40
Abbildung 7: Elektronenübergänge im Neodym des Nd:YAG-Lasers während des Laserprozesses	40
Abbildung 8: Schema der Laserablation mit dem NRW-213, New Wave	43
Abbildung 9: Schema der Ablation eines Linienscans, wobei der farbige mondsichelförmige Bereich einem ablatierten Segment entspricht (frei nach ^[138])	44
Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung des Grundprinzips der Röntgenfluoreszenzanalyse: Emission charakteristischer Röntgenstrahlung.....	50
Abbildung 11: Energieschema der Röntgenfluoreszenzübergänge.....	50
Abbildung 12: Vereinfachter schematischer Aufbau von BESSY II (nach www.helmholtz-berlin.de)	52
Abbildung 13: Photos der Modellorganismen; von links nach rechts: Fadenalgen (<i>Zygnema</i>), Wasserlinsen ^[185] (<i>Lemna minor</i>), Gartenkresse ^[186] (<i>Lepidium sativum</i>), Wasserfloh (<i>Daphnia magna</i>).....	56
Abbildung 14: oben: Schematische Darstellung eines Wurzelquerschnitts, unten links & rechts: Stofftransportes durch die Zellen von der Rinde zum Zentralzylinder am	

Casparischen Streifen vorbei; 1, 2 und 3 beschreiben schematisch die möglichen Wege in der Endodermis: Den 1. Weg durchläuft eine Substanz, die vom Casparischen Streifen in der Endodermis aufgehalten wird und dadurch nicht in den Zentralzylinder gelangen kann. Auf dem 2. Weg werden Substanzen transportiert, die sich im apoplastischen Raum befinden und die nicht im symplastischen Raum selektiert werden. Beim 3. Weg findet der Stofftransport vor und nach dem Casparischen Streifen innerhalb des symplastischen Raumes statt. frei nach [189] & [190].....	60
Abbildung 15: Lichtmikroskopaufnahme einer Daphnie mit Benennung der Körperteile	61
Abbildung 16: Vereinfachte Darstellung der Messanordnung der SRXRF-Messungen.....	64
Abbildung 17: Probenträger mit noch nicht eingetrockneten Tropfen der Reihen 1-7 in Konzentrationen von 100 µg l ⁻¹ auf Klebeband	69
Abbildung 18: Schema der Ablation der Blindwertkresseblätter, der Kalibrierreihen und des Kresseblattes zur Quantifizierung von Pr und Gd in einem exponierten Kresseblatt.	81
Abbildung 19: Intensitätsverteilungen von elf eingetrockneten 1 µl Multielementstandardtropfen von ¹⁵⁸ Gd in Absolutmengen von 0.16 ng, 0.31 ng, 0.63 ng, 1.25 ng, 2.5 ng, 5 ng, 10 ng und vier Blindwerten.....	86
Abbildung 20: Kalibriergraphen der eingetrockneten 1 µl Multielementstandardtropfen der Isotope ²⁵ Mg, ⁴⁴ Ca, ⁵⁵ Mn, ⁵⁶ Fe, ⁶³ Cu, ¹¹⁴ Cd, ¹⁴¹ Pr und ¹⁵⁸ Gd in den Absolutmengen 0.16 ng, 0.31 ng, 0.63 ng, 1.25 ng, 2.5 ng, 5 ng, 10 ng gemessen mit LA-ICP-MS	88
Abbildung 21: Mittels SRXRF gemessene normierte Spektren der sieben eingetrockneten Tropfen, Luft und Tesafilm; Die nummerierten Abbildungen enthalten die folgenden Elemente: 1: Cu, Fe, Yb; 2: Zn, I, Gd; 3: Ca, La, Tb; 4: Pr, Er, Yb; 5: Cu, I, Eu; 6: La, Ho, Tm; 7: Gd.....	90
Abbildung 22: a) Photo von Fadenalgen; b) Intensitätsverteilung von ¹⁵⁸ Gd in Fadenalgen nach 7 Tagen Exposition mit 50 mg l ⁻¹ Gd-DTPA-BMA (III-3.1 Aufnahme und Abgabe eines Kontrastmittels durch Fadenalgen; 7 d in 50 mg Gd l ⁻¹ Gd-DTPA-BMA-Lösung); c) Intensitätsverteilung von ¹⁵⁸ Gd in Fadenalgen nach 7 Tagen Exposition mit 50 mg l ⁻¹ Gd-DTPA-BMA und 3 Tagen in Gd-freier Nährlösung	93
Abbildung 23: Photos und LA-ICP-MS-Intensitätsverteilungen von ¹⁵⁸ Gd in Wasserlinsen nach einer Expositionsdauer von 7 Tagen in verschiedenen Konzentrationen (0 mg Gd l ⁻¹ , 0.1 mg Gd l ⁻¹ , 1 mg Gd l ⁻¹ und 10 mg Gd l ⁻¹) Gd-DTPA-BMA	96

Abbildung 24: Photo und LA-ICP-MS-Intensitätsverteilungen von ^{158}Gd in Wasserlinsen nach 0, 1, 2, 5 und 7 Tagen der Exposition mit 10 mg Gd l^{-1} Gd-DTPA-BMA-Lösung	98
Abbildung 25: a) & b) Mikroskopbilder der untersuchten Kresse (III-5.1.2 Bestimmung der Gd-Verteilung mittels $\mu\text{-SRXRF}$ und LA-ICP-MS; 9 d in 10 mg Gd l^{-1} Gd-DTPA-Lösung) und dessen Blatt; c) Intensitätsverteilung von ^{158}Gd im Kresseblatt; d) Intensitätsverteilung von ^{158}Gd in einem Teil des Stängels; e) Intensitätsverteilung von ^{158}Gd in einem Teil der Wurzel	104
Abbildung 26: a) Photo eines Kresseblattes (dasselbe wie das mit der LA-ICP-MS Untersuchte) und b) SRXRF-Intensitätsverteilung von Gadolinium	106
Abbildung 27: LA-ICP-MS-Verteilungen von ^{112}Cd und ^{158}Gd in einem Kresseblatt (III-5.1.3 Bestimmung der Cd- & Gd-Verteilung mittels LA-ICP-MS, acht Tage auf Sand mit $10 \text{ mg Cd und Gd kg}^{-1}$)	107
Abbildung 28: links: Photo einer Kressepflanze; oben rechts: LA-ICP-MS-Verteilung von ^{141}Pr im rechten Blatt der Pflanze; unten rechts: LA-ICP-MS-Verteilung von ^{158}Gd im rechten Blatt der Pflanze	108
Abbildung 29: LA-ICP-MS-Intensitätsverteilungen von ^{25}Mg , ^{44}Ca , ^{63}Cu und ^{158}Gd in einem Kresseblattes	111
Abbildung 30: Lichtmikroskopbilder und Intensitätsverteilungen von ^{127}I , ^{158}Gd und deren Quotienten $^{158}\text{Gd}/^{127}\text{I}$ in iodierter getrockneter Kresse und frischer Kresse	113
Abbildung 31: links: Intensitätsprofil von ^{137}Ba eines Linienscans auf einem Glasobjektträger; rechts: Gemittelte ^{137}Ba -Intensität mit Standardabweichungen der Normierungslinien während der Messung eines Kresseblattes	116
Abbildung 32: Gemittelte ^{137}Ba -Intensität der Normierungslinien mit den Standardabweichungen während der Messung des Kresseblattes (III-5.1.6 Untersuchung der Verteilung von Pr und Bestimmung des Gd-Gehaltes mittels ICP-MS, $\mu\text{-SRXRF}$ & LA-ICP-MS).....	117
Abbildung 33: LA-ICP-MS-Intensitätsverteilungen von ^{141}Pr - und ^{158}Gd in fünf eingetrockneten $1\mu\text{l}$ Tropfen mit je $1 \text{ mg Pr und Gd l}^{-1}$ Pr-DOTA- und Gd-DOTA-Lösung auf Kresseblättern fixiert auf Klebeband	119

Abbildung 34: oben: Photo des untersuchten Kresseblattes, das mit 100 mg Gd l ⁻¹ Gd-DOTA-Lösung (Dotarem) und 100 mg Pr l ⁻¹ Pr-DOTA-Lösung 7 × 2 h exponiert war; mitte: LA-ICP-MS-Massenverteilungen von ¹⁴¹ Pr normiert auf ¹³⁷ Ba; unten: LA-ICP-MS-Massenverteilung von ¹⁵⁸ Gd normiert auf ¹³⁷ Ba	122
Abbildung 35: SRXRF-Spektrum eines Punktes an der Blattspitze vom untersuchten Einzelkresseblatt	123
Abbildung 36: oben: Photo des untersuchten Kresseblattes; mitte: SRXRF-Intensitätsverteilungen von Pr und unten: Gd.....	125
Abbildung 37: links: Lichtmikroskopaufnahme; rechts: mittels LA-ICP-MS gemessene Intensitäten von ¹⁵⁸ Gd in Daphnie 1 (19 h in 100 mg Gd l ⁻¹ Gd-DTPA-Lösung)	130
Abbildung 38: a) Lichtmikroskopaufnahme der belasteten Daphnie (19 h in 100 mg Gd l ⁻¹ Gd-DTPA-Lösung), b) bis e) zweidimensionale Seiten- und seitliche Frontansicht mit je zwei Grauwertspreizungen der Schwächungskoeffizienten in der belasteten Daphnie ermittelt mit der dreidimensionalen μ -CT; f) bis i) zweidimensionale Seiten- und seitliche Frontansicht der Schwächungskoeffizienten in der unbelasteten Daphnie ermittelt mit der dreidimensionalen μ -CT.....	132
Abbildung 39: Lichtmikroskopaufnahme einer Daphnie & LA-ICP-MS-Intensitätsverteilung von ¹⁵⁸ Gd in einer Daphnie (19 h mit 28 mg Gd l ⁻¹ Gd-DTPA-Lösung enthaltenden Algen).....	135

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinisch relevante Gadolinium(III)-Chelate ^[51]	21
Tabelle 2: Logarithmische Stabilitätskonstanten einiger Gd-basierter Komplexe	22
Tabelle 3: Überblick über einige Untersuchungen zur Elementverteilung in biologischen Proben mit verschiedenen bildgebenden Methoden.....	26
Tabelle 4: Optimierte Messparameter für die LA-ICP-MS.....	63
Tabelle 5: Verwendete Parameter während der Untersuchung der Kresse nach Aufschluss mittels ICP-MS.....	64
Tabelle 6: Für die SRXRF verwendete Parameter	65
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller	65
Tabelle 8: Einwaagen für das WC-Medium	71
Tabelle 9: Einwaagen für das SIS-Medium.....	72
Tabelle 10: Temperatur- und Druckverlauf während des Mikrowellenaufschlusses.....	79
Tabelle 11: Einwaagen für das Elendt M4-Medium.....	82
Tabelle 12: Bestimmtheitsmaße, Steigungen, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der eingetrockneten Multielementstandardtropfen auf einem Adhäsionsglasobjektträger	88
Tabelle 13: Mittels SRXRF ermittelte Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen (BG = 3 · NG) von je 1 µl eingetrockneten Multielementstandardtropfen auf Klebeband normiert auf 1000 s Messzeit	91
Tabelle 14: Vergleich der mit beiden Methoden (LA-ICP-MS und SRXRF) ermittelten Nachweisgrenzen, bestimmt mit Hilfe eingetrockneter Multielementstandardtropfen (III-2. Nachweisgrenzen mittels aufgetropfter Standards).....	92
Tabelle 15: Mittels ICP-MS bestimmte Gehalte in Feucht- und Trockenmasse von Kresse (zwei Tage in 10 mg Gd kg ⁻¹ Gd-DOTA-Lösung, siehe III-5.1.1 Gesamtbestimmung von Gd nach Aufschluss) in den verschiedenen aufgeschlossenen Kressekompartimenten nach einem Mikrowellenaufschluss	101
Tabelle 16: Übersicht über die mit den drei verwendeten Methoden bestimmten Gehalte von Pr und Gd in einem Kresseblatt.....	127

2. Literaturverzeichnis

- [1] L. R. Muroff, "MRI contrast: current agents and issues", *Applied Radiology*, 2001, 5-7.
- [2] J. M. Idee, M. Port, I. Raynal, M. Schaefer, S. Le Greneur, and C. Corot, "Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review", *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2006, 20, 563-576.
- [3] C. S. K. Raju, A. Cossmer, H. Scharf, U. Panne, and D. Luck, "Speciation of gadolinium based MRI contrast agents in environmental water samples using hydrophilic interaction chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2010, 25, 55-61.
- [4] K. Kuemmerer and E. Helmers, "Hospital effluents as a source of gadolinium in the aquatic environment", *Environmental Science & Technology*, 2000, 34, 573-577.
- [5] P. Moeller, T. Paces, P. Dulski, and G. Morteani, "Anthropogenic Gd in surface water, drainage system, and the water supply of the city of Prague, Czech Republic", *Environmental Science & Technology*, 2002, 36, 2387-2394.
- [6] H. Ersoy and F. J. Rybicki, "Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis", *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2007, 26, 1190-1197.
- [7] S. M. Rocklage and A. D. Watson, "Chelates of Gadolinium and Dysprosium as Contrast Agents for Mr Imaging", *Jmri-Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 1993, 3, 167-178.
- [8] T. Frenzel, P. Lengsfeld, H. Schirmer, J. Hutter, and H. J. Weinmann, "Stability of Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents in Human Serum at 37 degrees C", *Investigative Radiology*, 2008, 43, 817-828.
- [9] B. H. Care, "Aktualisierte Sicherheitsinformationen zu Magnevist und Nephrogener Systemischer Fibrose (NSF)", *Bayer Vital*, 2007.
- [10] L. Telgmann, H. Faber, S. Jahn, D. Melles, H. Simon, M. Sperling, and U. Karst, "Identification and quantification of potential metabolites of Gd-based contrast agents by electrochemistry/separations/mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 2012, 1240, 147-155.
- [11] L. Telgmann, C. A. Wehe, J. Kunнемeyer, A. C. Bulter, M. Sperling, and U. Karst, "Speciation of Gd-based MRI contrast agents and potential products of transmetalation with iron ions or parenteral iron supplements", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 404, 2133-2141.
- [12] C. Zwiener, "Das Verhalten von Gadolinium-Spezies in der Trinkwasseraufbereitung", *GIT Labor-Fachzeitschrift* 10, 2007, 816.
- [13] M. Birka, C. A. Wehe, L. Telgmann, M. Sperling, and U. Karst, "Sensitive quantification of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in surface waters using hydrophilic interaction liquid chromatography and inductively coupled plasma sector field mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 2013, 1308, 125-131.
- [14] U. Lindner, J. Lingott, S. Richter, N. Jakubowski, and U. Panne, "Speciation of gadolinium in surface water samples and plants by hydrophilic interaction chromatography hyphenated

- with inductively coupled plasma mass spectrometry", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405, 1865-1873.
- [15] S. Kulaksiz and M. Bau, "Anthropogenic gadolinium as a microcontaminant in tap water used as drinking water in urban areas and megacities", *Applied Geochemistry*, 2011, 26, 1877-1885.
- [16] M. Bau and P. Dulski, "Anthropogenic origin of positive gadolinium anomalies in river waters", *Earth and Planetary Science Letters*, 1996, 143, 245-255.
- [17] S. Kulaksiz and M. Bau, "Contrasting behaviour of anthropogenic gadolinium and natural rare earth elements in estuaries and the gadolinium input into the North Sea", *Earth and Planetary Science Letters*, 2007, 260, 361-371.
- [18] S. Wang, R. Brown, and D. J. Gray, "Application of Laser Ablation-Icpms to the Spatially-Resolved Microanalysis of Biological Tissue", *Applied Spectroscopy*, 1994, 48, 1321-1325.
- [19] C. Giesen, L. Waentig, T. Mairinger, D. Drescher, J. Kneipp, P. H. Roos, U. Panne, and N. Jakubowski, "Iodine as an elemental marker for imaging of single cells and tissue sections by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2011, 26, 2160-2165.
- [20] S. M. Eggins, "Laser ablation ICP-MS analysis of geological materials prepared as lithium borate glasses", *Geostandards Newsletter-the Journal of Geostandards and Geoanalysis*, 2003, 27, 147-162.
- [21] Y. Orihashi and T. Hirata, "Rapid quantitative analysis of Y and REE abundances in XRF glass bead for selected GSJ reference rock standards using Nd-YAG 266 nm UV laser ablation ICP-MS", *Geochemical Journal*, 2003, 37, 401-412.
- [22] R. Lobinski, C. Moulin, and R. Ortega, "Imaging and speciation of trace elements in biological environment", *Biochimie*, 2006, 88, 1591-1604.
- [23] K. Takada, A. M. Ektessabi, and S. Yoshida, "SRXRF imaging of a single brain cell from a patient with Parkinson's disease", *Application of Accelerators in Research and Industry, Pts 1 and 2*, 1999, 475, 452-455.
- [24] D. S. Gholap, A. Izmer, B. De Samber, J. T. van Elteren, V. S. Selih, R. Evens, K. De Schamphelaere, C. Janssen, L. Balcaen, I. Lindemann, L. Vincze, and F. Vanhaecke, "Comparison of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry and micro-X-ray fluorescence spectrometry for elemental imaging in *Daphnia magna*", *Analytica Chimica Acta*, 2010, 664, 19-26.
- [25] D. Hare, C. Austin, and P. Doble, "Quantification strategies for elemental imaging of biological samples using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry", *Analyst*, 2012, 137, 1527-1537.
- [26] R. E. Russo, X. L. Mao, H. C. Liu, J. Gonzalez, and S. S. Mao, "Laser ablation in analytical chemistry - a review", *Talanta*, 2002, 57, 425-451.
- [27] H. Sela, Z. Karpas, M. Zoriy, C. Pickhardt, and J. S. Becker, "Biomonitoring of hair samples by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)", *International Journal of Mass Spectrometry*, 2007, 261, 199-207.

- [28] D. Kang, D. Amarasiriwardena, and A. H. Goodman, "Application of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and pulp", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378, 1608-1615.
- [29] E. Hoffmann, H. Stephanowitz, E. Ullrich, J. Skole, C. Luedke, and B. Hoffmann, "Investigation of mercury migration in human teeth using spatially resolved analysis by laser ablation-ICP-MS", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, 15, 663-667.
- [30] J. Cizdziel, K. X. Bu, and P. Nowinski, "Determination of elements in situ in green leaves by laser ablation ICP-MS using pressed reference materials for calibration", *Analytical Methods*, 2012, 4, 564-569.
- [31] J. Feldmann, A. Kindness, and P. Ek, "Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, 17, 813-818.
- [32] E. Hoffmann, C. Luedke, J. Skole, H. Stephanowitz, E. Ullrich, and D. Colditz, "Spatial determination of elements in green leaves of oak trees (*Quercus robur*) by laser ablation-ICP-MS", *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 367, 579-585.
- [33] M. S. Jimenez, M. T. Gomez, and J. R. Castillo, "Multi-element analysis of compost by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry", *Talanta*, 2007, 72, 1141-1148.
- [34] J. L. Todoli and J. M. Mermet, "Study of polymer ablation products obtained by ultraviolet laser ablation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 1998, 53, 1645-1656.
- [35] J. S. Becker, H. Sela, J. Dobrowolska, M. Zoriy, and J. S. Becker, "Recent applications on isotope ratio measurements by ICP-MS and LA-ICP-MS on biological samples and single particles", *International Journal of Mass Spectrometry*, 2008, 270, 1-7.
- [36] M. V. Zoriy and J. S. Becker, "Imaging of elements in thin cross sections of human brain samples by LA-ICP-MS: A study on reproducibility", *International Journal of Mass Spectrometry*, 2007, 264, 175-180.
- [37] J. Seuma, J. Bunch, A. Cox, C. McLeod, J. Bell, and C. Murray, "Combination of immunohistochemistry and laser ablation ICP mass spectrometry for imaging of cancer biomarkers", *Proteomics*, 2008, 8, 3775-3784.
- [38] J. S. Becker, A. Matusch, C. Palm, D. Salber, K. A. Morton, and J. S. Becker, "Bioimaging of metals in brain tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and metallomics", *Metallomics*, 2010, 2, 104-111.
- [39] B. Wu, M. Zoriy, Y. X. Chen, and J. S. Becker, "Imaging of nutrient elements in the leaves of *Elsholtzia splendens* by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)", *Talanta*, 2009, 78, 132-137.
- [40] B. Wu, Y. X. Chen, and J. S. Becker, "Study of essential element accumulation in the leaves of a Cu-tolerant plant *Elsholtzia splendens* after Cu treatment by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)", *Analytica Chimica Acta*, 2009, 633, 165-172.
- [41] C. Neubert, "Umweltverhalten und Ökotoxikologie von gadoliniumhaltigen Magnetresonanztomographie-Kontrastmitteln", *Dissertation*, 2008, Dissertation am Institut für Technischen Umweltschutz, Prozesswissenschaften, TU Berlin, 1-123.

- [42] C. A. Chang, "Magnetic-Resonance-Imaging Contrast Agents - Design and Physicochemical Properties of Gadodiamide", *Investigative Radiology*, 1993, 28, S21-S27.
- [43] M. F. Tweedle, G. T. Gaughan, J. Hagan, P. W. Wedeking, P. Sibley, L. J. Wilson, and D. W. Lee, "Considerations Involving Paramagnetic Coordination-Compounds as Useful NMR Contrast Agents", *Nuclear Medicine and Biology*, 1988, 15, 31-36.
- [44] Hollemann and Wiberg, "Lehrbuch der Anorganischen Chemie", *deGruyter*, 1995, 101. Auflage, 1838.
- [45] N. Itoh and M. Kawakita, "Characterization of Gd-3+ and Tb-3+ Binding-Sites on Ca-2+, Mg-2+-Adenosine Triphosphatase of Sarcoplasmic-Reticulum", *Journal of Biochemistry*, 1984, 95, 661-669.
- [46] J. B. Lansman, "Blockade of Current through Single Calcium Channels by Trivalent Lanthanide Cations - Effect of Ionic Radius on the Rates of Ion Entry and Exit", *Journal of General Physiology*, 1990, 95, 679-696.
- [47] B. A. Biagi and J. J. Enyeart, "Gadolinium Blocks Low-Threshold and High-Threshold Calcium Currents in Pituitary-Cells", *American Journal of Physiology*, 1990, 259, C515-C520.
- [48] A. Spencer, S. Wilson, and E. Harpur, "Gadolinium chloride toxicity in the mouse", *Human & Experimental Toxicology*, 1998, 17, 633-637.
- [49] A. D. Watson, "The Use of Gadolinium and Dysprosium Chelate Complexes as Contrast Agents for Magnetic-Resonance-Imaging", *Journal of Alloys and Compounds*, 1994, 207, 14-19.
- [50] U. Lindner, J. Lingott, N. Jakubowski, and U. Panne, "Der Nachweis von Gadolinium - Kontrastmittel in Oberflächengewässern und Pflanzen", *GIT Labor-Fachzeitschrift* 7, 2013, 434-436.
- [51] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, and R. B. Lauffer, "Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications", *Chemical Reviews*, 1999, 99, 2293-2352.
- [52] P. Yerram, G. Saab, P. R. Karuparthi, M. R. Hayden, and R. Khanna, "Nephrogenic systemic fibrosis: A mysterious disease in patients with renal failure-role of gadolinium-based contrast media in causation and the beneficial effect of intravenous sodium thiosulfate", *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2007, 2, 258-263.
- [53] R. M. Smith, R. J. Motekaitis, and A. E. Martell, *NIST Standard Reference Database #46*, 1997, 3.0 ed, National Institute of Standards and Technology, Washington, DC.
- [54] W. P. Cacheris, S. C. Quay, and S. M. Rocklage, "The Relationship between Thermodynamics and the Toxicity of Gadolinium Complexes", *Magnetic Resonance Imaging*, 1990, 8, 467-481.
- [55] K. Kuemar, C. A. Chang, L. C. Francesconi, D. D. Dischino, M. F. Malley, J. Z. Gougoutas, and M. F. Tweedle, "Synthesis, Stability, and Structure of Gadolinium(III) and Yttrium(III) Macrocyclic Poly(Amino Carboxylates)", *Inorganic Chemistry*, 1994, 33, 3567-3575.
- [56] W. P. Cacheris, S. K. Nickle, and A. D. Sherry, "Thermodynamic Study of Lanthanide Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane-N,N',N''-Triacetic Acid and 1,4,7,10-

- Tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-Tetraacetic Acid", *Inorganic Chemistry*, 1987, 26, 958-960.
- [57] E. T. Clarke and A. E. Martell, "Stabilities of Trivalent Metal-Ion Complexes of the Tetraacetate Derivatives of 12-Membered, 13-Membered and 14-Membered Tetraazamacrocycles", *Inorganica Chimica Acta*, 1991, 190, 37-46.
- [58] X. Y. Wang, T. Z. Jin, V. Comblin, A. Lopez-Mut, E. Merciny, and J. F. Desreux, "A Kinetic Investigation of the Lanthanide DOTA Chelates - Stability and Rates of Formation and of Dissociation of a Macrocyclic Gadolinium(III) Polyaza Polycarboxylic MRI Contrast Agent", *Inorganic Chemistry*, 1992, 31, 1095-1099.
- [59] D. Meyer, M. Schaefer, and D. Doucet, "Advances in Macrocyclic Gadolinium Complexes as Magnetic-Resonance-Imaging Contrast Agents", *Investigative Radiology*, 1990, 25, 53-55.
- [60] A. Bianchi, L. Calabi, F. Corana, S. Fontana, P. Losi, A. Maiocchi, L. Paleari, and B. Valtancoli, "Thermodynamic and structural properties of Gd(III) complexes with polyamino-polycarboxylic ligands: basic compounds for the development of MRI contrast agents", *Coordination Chemistry Reviews*, 2000, 204, 309-393.
- [61] M. M. Vora, S. Wukovnig, R. D. Finn, A. M. Emran, T. E. Boothe, and P. J. Kothari, "Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Gadolinium-Diethylenetriaminepentaacetic Acid Complex", *Journal of Chromatography*, 1986, 369, 187-192.
- [62] L. Telgmann, M. Sperling, and U. Karst, "Determination of gadolinium-based MRI contrast agents in biological and environmental samples: A review", *Analytica Chimica Acta*, 2013, 764, 1-16.
- [63] M. F. Tweedle, J. J. Hagan, K. Kumar, S. Mantha, and C. A. Chang, "Reaction of Gadolinium Chelates with Endogenously Available Ions", *Magnetic Resonance Imaging*, 1991, 9, 409-415.
- [64] L. Sarka, L. Burai, and E. Brucher, "The rates of the exchange reactions between [Gd(DTPA)](2-) and the endogenous ions Cu²⁺, and Zn²⁺: A kinetic model for the prediction of the in vivo stability of [Gd(DTPA)](2-) used as a contrast agent in magnetic resonance imaging", *Chemistry-a European Journal*, 2000, 6, 719-724.
- [65] J. C. Pierrard, J. Rimbault, M. Aplincourt, S. Le Greneur, and M. Port, "New synthesis of a high molecular weight ligand derived from DOTA; thermodynamic stability of the MRI contrast agent formed with gadolinium", *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2008, 3, 243-252.
- [66] J. Kuennemeyer, L. Terborg, S. Nowak, C. Brauckmann, L. Telgmann, A. Albert, F. Tokmak, B. K. Kraemer, A. Guensel, G. A. Wiesmueller, and U. Karst, "Quantification and excretion kinetics of a magnetic resonance imaging contrast agent by capillary electrophoresis-mass spectrometry", *Electrophoresis*, 2009, 30, 1766-1773.
- [67] V. Loreti and J. Bettmer, "Determination of the MRI contrast agent Gd-DTPA by SEC-ICP-MS", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 379, 1050-1054.
- [68] J. Kuennemeyer, L. Terborg, S. Nowak, L. Telgmann, F. Tokmak, B. K. Kramer, A. Gunsell, G. A. Wiesmuller, J. Waldeck, C. Bremer, and U. Karst, "Analysis of the Contrast Agent Magnevist and Its Transmetalation Products in Blood Plasma by Capillary

- Electrophoresis/Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry", *Analytical Chemistry*, 2009, 81, 3600-3607.
- [69] W. A. High, J. F. Ranville, M. Brown, T. Punshon, A. Lanzirotti, and B. P. Jackson, "Gadolinium deposition in nephrogenic systemic fibrosis: An examination of tissue using synchrotron x-ray fluorescence spectroscopy", *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2010, 62, 38-44.
- [70] J. Kimura, T. Ishiguchi, J. Matsuda, R. Ohno, A. Nakamura, S. Kamei, K. Ohno, T. Kawamura, and K. Murata, "Human comparative study of zinc and copper excretion via urine after administration of magnetic resonance imaging contrast agents", *Radiat. Med.*, 2005, 23, 322-326.
- [71] A. Knappe, P. Moeller, P. Dulski, and A. Pekdeger, "Positive gadolinium anomaly in surface water and ground water of the urban area Berlin, Germany", *Chemie Der Erde-Geochemistry*, 2005, 65, 167-189.
- [72] F. Elbaz-Poulichet, J. L. Seidel, and C. Othoniel, "Occurrence of an anthropogenic gadolinium anomaly in river and coastal waters of Southern France", *Water Research*, 2002, 36, 1102-1105.
- [73] M. Bau, A. Knappe, and P. Dulski, "Anthropogenic gadolinium as a micropollutant in river waters in Pennsylvania, and in Lake Erie, northeastern United States", *Chemie Der Erde-Geochemistry*, 2006, 66, 143-152.
- [74] G. R. Choppin, "Speciation of Trivalent-F-Elements in Natural-Waters", *Journal of the Less-Common Metals*, 1986, 126, 307-313.
- [75] P. L. Verplanck, E. T. Furlong, J. L. Gray, P. J. Phillips, R. E. Wolf, and K. Esposito, "Evaluating the Behavior of Gadolinium and Other Rare Earth Elements through Large Metropolitan Sewage Treatment Plants", *Environmental Science & Technology*, 2010, 44, 3876-3882.
- [76] J. Kuennemeyer, L. Terborg, B. Meermann, C. Brauckmann, I. Moeller, I. M. A. Scheffer, and U. Karst, "Speciation Analysis of Gadolinium Chelates in Hospital Effluents and Wastewater Treatment Plant Sewage by a Novel HILIC/ICP-MS Method", *Environmental Science & Technology*, 2009, 43, 2884-2890.
- [77] M. G. Lawrence, J. Keller, and Y. Poussade, "Removal of magnetic resonance imaging contrast agents through advanced water treatment plants", *Water Science and Technology*, 2010, 61, 685-692.
- [78] P. Moeller, P. Dulski, M. Bau, A. Knappe, A. Pekdeger, and C. Sommer-von Jarmersted, "Anthropogenic gadolinium as a conservative tracer in hydrology", *Journal of Geochemical Exploration*, 2000, 69, 409-414.
- [79] G. Massmann, A. Knappe, D. Richter, and A. Pekdeger, "Investigating the influence of treated sewage on groundwater and surface water using wastewater indicators in Berlin, Germany", *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica*, 2004, 32, 336-350.
- [80] M. Arora, D. Hare, C. Austin, D. R. Smith, and P. Doble, "Spatial distribution of manganese in enamel and coronal dentine of human primary teeth", *Science of the Total Environment*, 2011, 409, 1315-1319.
- [81] J. S. Becker, U. Breuer, H. F. Hsieh, T. Osterholt, U. Kumtabtim, B. Wu, A. Matusch, J. A. Caruso, and Z. Y. Qin, "Bioimaging of Metals and Biomolecules in Mouse Heart by Laser

- Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Secondary Ion Mass Spectrometry", *Analytical Chemistry*, 2010, 82, 9528-9533.
- [82] J. S. Becker, J. Dobrowolska, M. Zoriy, and A. Matusch, "Imaging of uranium on rat brain sections using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: a new tool for the study of critical substructures affined to heavy metals in tissues", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008, 22, 2768-2772.
- [83] J. S. Becker, A. Matusch, C. Depboylu, J. Dobrowolska, and M. V. Zoriy, "Quantitative imaging of selenium, copper, and zinc in thin sections of biological tissues (Slugs-Genus arion) measured by laser ablation inductively coupled of plasma mass spectrometry", *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 6074-6080.
- [84] J. S. Becker, M. V. Zoriy, C. Pickhardt, N. Palomero-Gallagher, and K. Zilles, "Imaging of copper, zinc, and other elements in thin section of human brain samples (Hippocampus) by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry", *Analytical Chemistry*, 2005, 77, 3208-3216.
- [85] J. S. Becker, M. V. Zoriy, C. Pickhardt, and K. Zilles, "Copper, zinc, phosphorus and sulfur distribution in thin section of rat brain tissues measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: possibility for small-size tumor analysis", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2005, 20, 912-917.
- [86] S. F. Boulyga, D. Desideri, M. A. Meli, C. Testa, and J. S. Becker, "Plutonium and americium determination in mosses by laser ablation ICP-MS combined with isotope dilution technique", *International Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 226, 329-339.
- [87] S. F. Boulyga and K. G. Heumann, "Comparative LA-ICP-IDMS determinations of trace elements in powdered samples using laser ablation systems with low and high ablation rates", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, 19, 1501-1503.
- [88] S. Chandra, "SIMS ion microscopy as a novel, practical tool for subcellular chemical imaging in cancer research", *Applied Surface Science*, 2003, 203, 679-683.
- [89] J. Dobrowolska, M. Dehnhardt, A. Matusch, M. Zoriy, N. Palomero-Gallagher, P. Koscielniak, K. Zilles, and J. S. Becker, "Quantitative imaging of zinc, copper and lead in three distinct regions of the human brain by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry", *Talanta*, 2008, 74, 717-723.
- [90] D. Hare, C. Austin, P. Doble, and M. Arora, "Elemental bio-imaging of trace elements in teeth using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry", *Journal of Dentistry*, 2011, 39, 397-403.
- [91] E. Hoffmann, C. Luedke, H. Scholze, and H. Stephanowitz, "Analytical Investigations of Tree-Rings by Laser-Ablation Icp-Ms", *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1994, 350, 253-259.
- [92] I. A. Illan, J. M. Gorriz, J. Ramirez, E. W. Lang, D. Salas-Gonzalez, and C. G. Puntonet, "Bilateral symmetry aspects in computer-aided Alzheimer's disease diagnosis by single-photon emission-computed tomography imaging", *Artificial Intelligence in Medicine*, 2012, 56, 191-198.

- [93] B. Jackson, S. Harper, L. Smith, and J. Flinn, "Elemental mapping and quantitative analysis of Cu, Zn, and Fe in rat brain sections by laser ablation ICP-MS", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 384, 951-957.
- [94] N. Kamaly, J. A. Pugh, T. L. Kalber, J. Bunch, A. D. Miller, C. W. McLeod, and J. D. Bell, "Imaging of Gadolinium Spatial Distribution in Tumor Tissue by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry", *Molecular Imaging and Biology*, 2010, 12, 361-366.
- [95] A. Kindness, C. N. Sekaran, and J. Feldmann, "Two-dimensional mapping of copper and zinc in liver sections by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry", *Clinical Chemistry*, 2003, 49, 1916-1923.
- [96] K. L. Liu, C. C. Wu, Y. J. Huang, H. L. Peng, H. Y. Chang, P. Chang, L. Hsu, and T. R. Yew, "Novel microchip for in situ TEM imaging of living organisms and bio-reactions in aqueous conditions", *Lab on a Chip*, 2008, 8, 1915-1921.
- [97] Q. Liu, Y. S. Xiao, C. Pagan-Miranda, Y. M. Chiu, and L. He, "Metabolite Imaging Using Matrix-Enhanced Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (ME-SALDI-MS)", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009, 20, 80-88.
- [98] A. Matusch, C. Depboylu, C. Palm, B. Wu, G. U. Hoglinger, M. K. H. Schafer, and J. S. Becker, "Cerebral Bioimaging of Cu, Fe, Zn, and Mn in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS)", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2010, 21, 161-171.
- [99] K. Melessanaki, V. Papadakis, C. Balas, and D. Anglos, "Laser induced breakdown spectroscopy and hyper-spectral imaging analysis of pigments on an illuminated manuscript", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2001, 56, 2337-2346.
- [100] J. L. Norris and R. M. Caprioli, "Analysis of Tissue Specimens by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry in Biological and Clinical Research", *Chemical Reviews*, 2013, 113, 2309-2342.
- [101] A. Polatajko, M. Azzolini, I. Feldmann, T. Stuezel, and N. Jakubowski, "Laser ablation-ICP-MS assay development for detecting Cd- and Zn-binding proteins in Cd-exposed *Spinacia oleracea* L.", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2007, 22, 878-887.
- [102] M. C. Santos, M. Wagner, B. Wu, J. Scheider, J. Oehlmann, S. Cadore, and J. S. Becker, "Biomonitoring of metal contamination in a marine prosobranch snail (*Nassarius reticulatus*) by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)", *Talanta*, 2009, 80, 428-433.
- [103] P. J. Todd, T. G. Schaaff, P. Chaurand, and R. M. Caprioli, "Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization", *Journal of Mass Spectrometry*, 2001, 36, 355-369.
- [104] Y. Yuan, Z. X. Gu, X. F. Tao, and S. Y. Liu, "Computer tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography or positron emission tomography/computer tomography for detection of metastatic lymph nodes in patients with ovarian cancer: A meta-analysis", *European Journal of Radiology*, 2012, 81, 1002-1006.
- [105] M. Zoriy, A. Matusch, T. Spruss, and J. S. Becker, "Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for imaging of copper, zinc, and platinum in thin sections of a

- kidney from a mouse treated with cis-platin", *International Journal of Mass Spectrometry*, 2007, 260, 102-106.
- [106] M. V. Zoriy, M. Dehnhardt, A. Matusch, and J. S. Becker, "Comparative imaging of P, S, Fe, Cu, Zn and C in thin sections of rat brain tumor as well as control tissues by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2008, 63, 375-382.
- [107] M. V. Zoriy, M. Dehnhardt, G. Reifenberger, K. Zilles, and J. S. Becker, "Imaging of Cu, Zn, Pb and U in human brain tumor resections by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry", *International Journal of Mass Spectrometry*, 2006, 257, 27-33.
- [108] R. S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesch, H. J. Svec, A. L. Gray, and C. E. Taylor, "Inductively Coupled Argon Plasma as an Ion-Source for Mass-Spectrometric Determination of Trace-Elements", *Analytical Chemistry*, 1980, 52, 2283-2289.
- [109] B. Lange, S. Recknagel, M. Czerwensky, R. Matschat, M. Michaelis, B. Peplinski, and U. Panne, "Analysis of pure copper - a comparison of analytical methods", *Microchimica Acta*, 2008, 160, 97-107.
- [110] F. L. M. Rasdi, N. K. Abu Bakar, and S. Mohamad, "A Comparative Study of Selected Trace Element Content in Malay and Chinese Traditional Herbal Medicine (THM) Using an Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP-MS)", *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14, 3078-3093.
- [111] T. Scientific, "Thermo Scientific ELEMENT XR: Extended Dynamic Range High Resolution ICP-MS", *Application Note: 30064*, 2005, 1-4.
- [112] R. Thomas, "Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, Second Edition", *Practical Guide to Icp-Ms: A Tutorial for Beginners, Second Edition*, 2008, 1-339.
- [113] J. W. Lam and J. W. McLaren, "Use of Aerosol Processing and Nitrogen - Argon Plasmas for Reduction of Oxide Interference in Inductively Coupled Plasma Mass-Spectrometry", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1990, 5, 419-424.
- [114] R. Thomas, "A Beginner's Guide to ICP-MS, Part II: The Sample-Introduction System", *Spectroscopy*, 2001, 16, 56-60.
- [115] F. G. Ruedenauer, W. Steiger, and H. W. Werner, "Use of Saha-Eggert Equation for Quantitative Sims Analysis Using Argon Primary Ions", *Surface Science*, 1976, 54, 553-560.
- [116] H. Niu and R. S. Houk, "Fundamental aspects of ion extraction in inductively coupled plasma mass spectrometry", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 1996, 51, 779-815.
- [117] R. Thomas, "A Beginner's Guide to ICP-MS, Part V: The Ion Focusing System", *Spectroscopy*, 2001, 38-44.
- [118] R. Cornelis, J. Caruso, H. Crews, and K. Heumann, "Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology", *John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England*, 2003, 1.
- [119] <http://www.ahf.de/img/150-12.jpg>.
- [120] <http://www.ahf.de/img/300-32.jpg>.

- [121] K. E. Sjastad, T. Andersen, and S. L. Simonsen, "Application of laser ablation inductively coupled plasma multicollector mass spectrometry in determination of lead isotope ratios in common glass for forensic purposes", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2013, 89, 84-92.
- [122] T. M. Do, H. F. Hsieh, W. C. Chang, E. E. Chang, and C. F. Wang, "Analysis of liquid samples using dried-droplet laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2011, 66, 610-618.
- [123] A. L. Gray, "Solid Sample Introduction by Laser Ablation for Inductively Coupled Plasma Source-Mass Spectrometry", *Analyst*, 1985, 110, 551-556.
- [124] S. Bashir, M. S. Rafique, and W. Husinsky, "Surface topography (nano-sized hillocks) and particle emission of metals, dielectrics and semiconductors during ultra-short-laser ablation: Towards a coherent understanding of relevant processes", *Applied Surface Science*, 2009, 255, 8372-8376.
- [125] J. Koelbl, M. Froeschl, A. Seedsman, Y. Gao, and M. Dawson, "Fast Switching Pockels Cell Driver for SLR Laser System".
- [126] B. Hattendorf, C. Latkoczy, and D. Guenther, "Laser ablation-ICPMS.", *Analytical Chemistry*, 2003, 75, 341a-347a.
- [127] H. R. Kuhn and D. Guenther, "Laser ablation-ICP-MS: particle size dependent elemental composition studies on filter-collected and online measured aerosols from glass", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, 19, 1158-1164.
- [128] J. Koch, A. von Bohlen, R. Hergenroeder, and K. Niemax, "Particle size distributions and compositions of aerosols produced by near-IR femto- and nanosecond laser ablation of brass", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, 19, 267-272.
- [129] B. Fernandez, F. Claverie, C. Pecheyran, and O. F. X. Donard, "Direct analysis of solid samples by fs-LA-ICP-MS", *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26, 951-966.
- [130] R. Le Harzic, N. Huot, E. Audouard, C. Jonin, P. Laporte, S. Valette, A. Fraczkiwicz, and R. Fortunier, "Comparison of heat-affected zones due to nanosecond and femtosecond laser pulses using transmission electronic microscopy", *Applied Physics Letters*, 2002, 80, 3886-3888.
- [131] R. Glaus, R. Kaegi, F. Krumeich, and D. Guenther, "Phenomenological studies on structure and elemental composition of nanosecond and femtosecond laser-generated aerosols with implications on laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2010, 65, 812-822.
- [132] S. M. Eggins, L. P. J. Kinsley, and J. M. G. Shelley, "Deposition and element fractionation processes during atmospheric pressure laser sampling for analysis by ICP-MS", *Applied Surface Science*, 1998, 127, 278-286.
- [133] J. Koch, M. Walle, S. Schlamp, T. Rosgen, and D. Guenther, "Expansion phenomena of aerosols generated by laser ablation under helium and argon atmosphere", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2008, 63, 37-41.
- [134] C. C. Garcia, H. Lindner, and K. Niemax, "Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry-current shortcomings, practical suggestions for improving performance,

- and experiments to guide future development", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2009, 24, 14-26.
- [135] H. R. Kuhn and D. Guenther, "Elemental fractionation studies in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry on laser-induced brass aerosols", *Analytical Chemistry*, 2003, 75, 747-753.
- [136] M. Guillong and D. Guenther, "Effect of particle size distribution on ICP-induced elemental fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, 17, 831-837.
- [137] M. Guillong, H. R. Kuhn, and D. Guenther, "Application of a particle separation device to reduce inductively coupled plasma-enhanced elemental fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2003, 58, 211-220.
- [138] L. Mueller, H. Traub, N. Jakubowski, D. Drescher, V. I. Baranov, and J. Kneipp, "Trends in single-cell analysis by use of ICP-MS", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406, 6963-6977.
- [139] H. P. Longerich, S. E. Jackson, and D. Guenther, "Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometric transient signal data acquisition and analyte concentration calculation", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1996, 11, 899-904.
- [140] L. Waentig, N. Jakubowski, H. Hayen, and P. H. Roos, "Iodination of proteins, proteomes and antibodies with potassium triiodide for LA-ICP-MS based proteomic analyses", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2011, 26, 1610-1618.
- [141] I. Krosalakova and D. Guenther, "Elemental fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry: evidence for mass load induced matrix effects in the ICP during ablation of a silicate glass", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2007, 22, 51-62.
- [142] P. E. Janney, F. M. Richter, R. A. Mendybaev, M. Wadhwa, R. B. Georg, E. B. Watson, and R. R. Hines, "Matrix effects in the analysis of Mg and Si isotope ratios in natural and synthetic glasses by laser ablation-multicollector ICPMS: A comparison of single- and double-focusing mass spectrometers", *Chemical Geology*, 2011, 281, 26-40.
- [143] D. Guenther and C. A. Heinrich, "Comparison of the ablation behaviour of 266 nm Nd : YAG and 193 nm ArF excimer lasers for LA-ICP-MS analysis", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1999, 14, 1369-1374.
- [144] J. H. Macedone, D. J. Gammon, and P. B. Farnsworth, "Factors affecting analyte transport through the sampling orifice of an inductively coupled plasma mass spectrometer", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2001, 56, 1687-1695.
- [145] C. Pickhardt, A. V. Izmer, M. V. Zoriy, D. Schaumloeffel, and J. S. Becker, "On-line isotope dilution in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry using a microflow nebulizer inserted in the laser ablation chamber", *International Journal of Mass Spectrometry*, 2006, 248, 136-141.
- [146] M. Thompson, S. Chenery, and L. Brett, "Calibration Studies in Laser Ablation Microprobe - Inductively Coupled Plasma Atomic Emission-Spectrometry", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1989, 4, 11-16.

- [147] C. Pickhardt, J. S. Becker, and H. J. Dietze, "A new strategy of solution calibration in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for multielement trace analysis of geological samples", *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 368, 173-181.
- [148] D. Guenther, H. Cousin, B. Magyar, and I. Leopold, "Calibration studies on dried aerosols for laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1997, 12, 165-170.
- [149] J. E. Reid, I. Horn, H. P. Longerich, L. Forsythe, and G. A. Jenner, "Determination of Zr and Hf in a flux-free fusion of whole rock samples using laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) with isotope dilution calibration", *Geostandards Newsletter-the Journal of Geostandards and Geoanalysis*, 1999, 23, 149-155.
- [150] B. Fernandez, P. Rodriguez-Gonzalez, J. I. G. Alonso, J. Malherbe, S. Garcia-Fonseca, R. Pereiro, and A. Sanz-Medel, "On-line double isotope dilution laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for the quantitative analysis of solid materials", *Analytica Chimica Acta*, 2014, 851, 64-71.
- [151] M. Tibi and K. G. Heumann, "Multi-element trace determinations in pure alkaline earth fluoride powders by high-resolution ICP-MS using wet-chemical sample preparation and laser ablation", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 377, 126-131.
- [152] S. F. Boulyga, J. Heilmann, T. Prohaska, and K. G. Heumann, "Development of an accurate, sensitive, and robust isotope dilution laser ablation ICP-MS method for simultaneous multi-element analysis (chlorine, sulfur, and heavy metals) in coal samples", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389, 697-706.
- [153] J. Heilmann, S. F. Boulyga, and K. G. Heumann, "Development of an isotope dilution laser ablation ICP-MS method for multi-element determination in crude and fuel oil samples", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2009, 24, 385-390.
- [154] E. Hoffmann, C. Ludke, J. Skole, H. Stephanowitz, J. Wollbrandt, and W. Becker, "New methodical and instrumental developments in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2002, 57, 1535-1545.
- [155] A. M. Leach and G. M. Hieftje, "Standardless semiquantitative analysis of metals using single-shot laser ablation inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry", *Analytical Chemistry*, 2001, 73, 2959-2967.
- [156] V. B. Baryshev, G. N. Kulipanov, and A. N. Skrinsky, "Review of X-Ray Fluorescent Analysis Using Synchrotron Radiation", *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment*, 1986, 246, 739-750.
- [157] www.helmholtz-berlin.de
- [158] A. N. Kadachi and M. A. Al-Eshaikh, "Limits of detection in XRF spectroscopy", *X-Ray Spectrometry*, 2012, 41, 350-354.
- [159] R. Goergl, P. Wobrauschek, P. Kregsamer, C. Streli, M. Haller, A. Knoechel, and M. Radtke, "Total reflection x-ray fluorescence analysis excited by synchrotron radiation (SR-TXRF): Variation of excitation conditions and sample geometries", *X-Ray Spectrometry*, 1997, 26, 189-194.

- [160] W. S. K. Bong, I. Nakai, S. Furuya, H. Suzuki, Y. Abe, K. Osaka, T. Matsumoto, M. Itou, N. Imai, and T. Ninomiya, "Development of heavy mineral and heavy element database of soil sediments in Japan using synchrotron radiation X-ray powder diffraction and high-energy (116 keV) X-ray fluorescence analysis 1. Case study of Kofu and Chiba region", *Forensic Science International*, 2012, 220, 33-49.
- [161] Y. L. Wang, Y. Qun, and J. M. Ablett, "Mapping metal elements of Shuangbai dinosaur fossil by synchrotron X-ray fluorescence microprobe", *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, 28, 1194-1198.
- [162] N. Edwards, H. Barden, P. Manning, U. Bergmann, and R. Wogelius, "Synchrotron Rapid Scanning X-Ray Fluorescence of Soft-Tissue Preserved in Fossils", *Journal of Vertebrate Paleontology*, 2011, 31, 104-104.
- [163] Y. Nishiwaki, M. Takatsu, N. Miyamoto, S. Watanabe, O. Shimoda, S. Muratsui, T. Nakanishi, and L. Nakai, "Analysis of trace elements in ceramic prints on automobile glasses for forensic examination using high-energy synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry", *Bunseki Kagaku*, 2007, 56, 1045-1052.
- [164] I. Bihannic, L. J. Michot, B. S. Lartiges, D. Vantelon, J. Labille, F. Thomas, J. Susini, M. Salome, and B. Fayard, "First direct visualization of oriented mesostructures in clay gels by synchrotron-based X-ray fluorescence microscopy", *Langmuir*, 2001, 17, 4144-4147.
- [165] M. C. C. Pinzani, A. Somogyi, A. S. Simionovici, S. Ansell, B. M. Steenari, and O. Lindqvist, "Direct determination of cadmium speciation in municipal solid waste fly ashes by synchrotron radiation induced mu-X-ray fluorescence and mu-X-ray absorption spectroscopy", *Environmental Science & Technology*, 2002, 36, 3165-3169.
- [166] K. A. Dyl, J. S. Cleverley, P. A. Bland, C. G. Ryan, L. A. Fisher, and R. M. Hough, "Quantified, whole section trace element mapping of carbonaceous chondrites by Synchrotron X-ray Fluorescence Microscopy: 1. CV meteorites", *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 2014, 134, 100-119.
- [167] G. F. Herzog, G. J. Flynn, S. R. Sutton, J. S. Delaney, A. N. Krot, and A. Meibom, "Low gallium and germanium contents in metal grains from the Bencubbin/CH-like meteorite Queen Alexandra range 94411 determined by synchrotron X-ray fluorescence analysis.", *Meteoritics & Planetary Science*, 2000, 35, A71-A71.
- [168] P. Fredrickx, I. De Ryck, K. Janssens, D. Schryvers, J. P. Petit, and H. Docking, "EPMA and mu-SRXRF analysis and TEM-based microstructure characterization of a set of Roman glass fragments", *X-Ray Spectrometry*, 2004, 33, 326-333.
- [169] D. Grolimund, M. Senn, M. Trottmann, M. Janousch, I. Bonhoure, A. M. Scheidegger, and M. Marcus, "Shedding new light on historical metal samples using micro-focused synchrotron X-ray fluorescence and spectroscopy", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2004, 59, 1627-1635.
- [170] G. Pepponi, P. Wobrauschek, F. Hegedus, C. Streli, N. Zoger, C. Jokubonis, G. Falkenberg, and H. Grimmer, "Synchrotron radiation total reflection X-ray fluorescence and energy dispersive X-ray fluorescence analysis on AP1 (TM) films applied to the analysis of trace elements in metal alloys for the construction of nuclear reactor core components: a comparison", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2001, 56, 2063-2071.

- [171] Y. Y. Huang, J. X. Lu, R. G. He, L. M. Zhao, Z. G. Wang, W. He, and Y. X. Zhang, "Study of human bone tumor slice by SRXRF microprobe", *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment*, 2001, 467, 1301-1304.
- [172] Y. X. Zhang, Y. S. Wang, Y. P. Zhang, G. L. Zhang, Y. Y. Huang, and W. He, "Investigation of elemental distribution in human femoral head by PIXE and SRXRF microprobe", *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2007, 260, 178-183.
- [173] V. Trunova, N. Parshina, and V. Kondratyev, "Determination of the distribution of trace elements in human hair as a function of the position on the head by SRXRF AND TXRF", *Journal of Synchrotron Radiation*, 2003, 10, 371-375.
- [174] R. R. Martin, S. J. Naftel, A. J. Nelson, A. B. Feilen, and A. Narvaez, "Synchrotron X-ray fluorescence and trace metals in the cementum rings of human teeth", *Journal of Environmental Monitoring*, 2004, 6, 783-786.
- [175] E. L. Zelentsov, T. N. Moroz, Y. P. Kolmogorov, V. E. Tolmachev, G. N. Dragun, N. A. Palchik, and T. N. Grigorieva, "The elemental SRXRF analysis and mineral composition of human salivary stones", *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment*, 2001, 470, 417-421.
- [176] X. H. Xu, J. Y. Shi, Y. X. Chen, S. G. Xue, B. Wu, and Y. Y. Huang, "An investigation of cellular distribution of manganese in hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. using SRXRF analysis", *Journal of Environmental Sciences-China*, 2006, 18, 746-751.
- [177] J. Y. Shi, X. F. Yuan, X. C. Chen, B. Wu, Y. Y. Huang, and Y. X. Chen, "Copper Uptake and Its Effect on Metal Distribution in Root Growth Zones of *Commelina communis* Revealed by SRXRF", *Biological Trace Element Research*, 2011, 141, 294-304.
- [178] T. I. Savchenko, O. V. Chankina, S. A. Popova, and K. P. Kutzenogii, "Synchrotron radiation X-ray fluorescence used to studying the migration of chemical elements in biogeochemical food chains", *Journal of Surface Investigation-X-Ray Synchrotron and Neutron Techniques*, 2011, 5, 1102-1106.
- [179] O. Lilje, E. Lilje, A. V. Marano, and F. H. Gleason, "Three dimensional quantification of biological samples using micro-computer aided tomography (microCT)", *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 92, 33-41.
- [180] S. J. Bogart, G. Spiers, and E. Cholewa, "X-ray mu CT imaging technique reveals corm microstructures of an arctic-boreal cotton-sedge, *Eriophorum vaginatum*", *Journal of Structural Biology*, 2010, 171, 361-371.
- [181] S. R. Stock, S. Nagaraja, J. Barss, T. Dahl, and A. Veis, "X-ray microCT study of pyramids of the sea urchin *Lytechinus variegatus*", *Journal of Structural Biology*, 2003, 141, 9-21.
- [182] V. Cnudde, B. Masschaele, H. E. V. De Cock, K. Olstad, L. Vlamincx, J. Vlassenbroeck, M. Dierick, Y. D. Witte, L. Van Hoorebeke, and P. Jacobs, "Virtual histology by means of high-resolution X-ray CT", *Journal of Microscopy*, 2008, 232, 476-485.
- [183] M. D. Sutton, "Tomographic techniques for the study of exceptionally preserved fossils", *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2008, 275, 1587-1593.

- [184] R. A. Ketcham and W. D. Carlson, "Acquisition, optimization and interpretation of X-ray computed tomographic imagery: applications to the geosciences", *Computers & Geosciences*, 2001, 27, 381-400.
- [185] <http://lepidoptera.butterflyhouse.com.au/plants/arac/lemna-minor.jpg>.
- [186] <http://de.wikipedia.org/wiki/Gartenkresse#mediaviewer/File:Gartenkresse.jpg>.
- [187] A. R. Yeo, M. E. Yeo, and T. J. Flowers, "The Contribution of an Apoplastic Pathway to Sodium Uptake by Rice Roots in Saline Conditions", *Journal of Experimental Botany*, 1987, 38, 1141-1153.
- [188] B. Nowack, R. Schulín, and B. H. Robinson, "Critical assessment of chelant-enhanced metal phytoextraction", *Environmental Science & Technology*, 2006, 40, 5225-5232.
- [189] http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/MathNat/Biologie/Didaktik/Wattenmeer/3_pflanzen/dateien/salzhaushalt.html.
- [190] http://www.euita.upv.es/varios/biologia/images/Figuras_tema12/Figura12_8.jpg.
- [191] M. Lontoc-Roy, P. Dutilleul, S. O. Prasher, L. W. Han, T. Brouillet, and D. L. Smith, "Advances in the acquisition and analysis of CT scan data to isolate a crop root system from the soil medium and quantify root system complexity in 3-D space", *Geoderma*, 2006, 137, 231-241.
- [192] www.epsag.uni-goettingen.de, "Medium Recipe - 24. WC-Medium", *SAG - Sammlung von Algenkulturen Göttingen*, 2007, 03, 1-3.
- [193] "OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Revised Proposal for a New Guideline 221, *Lemna* sp. Growth Inhibition Test", 2002, 1-22.
- [194] J. W. Tang and K. H. Johannesson, "Rare earth elements adsorption onto Carrizo sand: Influence of strong solution complexation", *Chemical Geology*, 2010, 279, 120-133.
- [195] G. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, *Daphnia magna* Reproduction Test, "OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Guideline 211, *Daphnia magna* Reproduction Test", 1998, 1-21.
- [196] P. J. Yunker, T. Still, M. A. Lohr, and A. G. Yodh, "Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions", *Nature*, 2011, 476, 308-311.
- [197] P. Isnard and S. Lambert, "Estimating Bioconcentration Factors from Octanol-Water Partition-Coefficient and Aqueous Solubility", *Chemosphere*, 1988, 17, 21-34.
- [198] B. E. Erenoglu, H. K. Patra, H. Khodr, V. Romheld, and N. Von Wiren, "Uptake and apoplastic retention of EDTA- and phytosiderophore-chelated chromium(III) in maize", *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*, 2007, 170, 788-795.
- [199] S. Laurent, L. V. Elst, and R. N. Muller, "Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents", *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2006, 1, 128-137.
- [200] P. T. Normann and P. A. Hals, "In vivo stability and excretion of gadodiamide (GdDTPA-BMA), a hydrophilic gadolinium complex used as a contrast enhancing agent for magnetic

- resonance imaging", *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 1995, 20, 307-313.
- [201] Y. Wang, M. Spiller, and P. Caravan, "Evidence for Weak Protein Binding of Commercial Extracellular Gadolinium Contrast Agents", *Magnetic Resonance in Medicine*, 2010, 63, 609-616.
- [202] S. Mishra, S. Srivastava, R. D. Tripathi, R. Govindarajan, S. V. Kuriakose, and M. N. V. Prasad, "Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L", *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44, 25-37.
- [203] A. Schuetzenduebel and A. Polle, "Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization", *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53, 1351-1365.
- [204] D. E. Salt, R. C. Prince, I. J. Pickering, and I. Raskin, "Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard", *Plant Physiology*, 1995, 109, 1427-1433.
- [205] D. A. Skoog and J. J. Leary, "Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen", *Springer*, 1996.
- [206] P. M. Outridge, W. Doherty, and D. C. Gregoire, "Ablative and transport fractionation of trace elements during laser sampling of glass and copper", *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 1997, 52, 2093-2102.
- [207] H. P. Longerich, D. Guenther, and S. E. Jackson, "Elemental fractionation in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry", *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1996, 355, 538-542.
- [208] J. C. G. Bunzli, "Benefiting from the unique properties of lanthanide ions", *Accounts of Chemical Research*, 2006, 39, 53-61.
- [209] S. Pieper, "Dissertation - Metallcheatkomplexe für die elementmassenspektrometrische Quantifizierung von Peptiden und Proteinen", 2008, 1-140.
- [210] M. Radtke, L. Vincze, and W. Gorner, "Quantification of energy dispersive SRXRF for the certification of reference materials at BAMline", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2010, 25, 631-634.
- [211] http://henke.lbl.gov/optical_constants/filter2.html.
- [212] S. R. Wild and K. C. Jones, "Organic-Chemicals Entering Agricultural Soils in Sewage Sludges - Screening for Their Potential to Transfer to Crop Plants and Livestock", *Science of the Total Environment*, **1992**, 119, 85-119.
- [213] Z. N. Dai, X. H. Xia, J. Guo, and X. M. Jiang, "Bioaccumulation and uptake routes of perfluoroalkyl acids in *Daphnia magna*", *Chemosphere*, **2013**, 90, 1589-1596.

3. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die mir die Promotionsarbeit an der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung ermöglicht und mich dabei unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ulrich Panne für die Möglichkeit zur Promotion an seinem Lehrstuhl und der BAM und für die Bereitstellung des spannenden Themas. Dr. Norbert Jakubowski möchte ich für die vielfältige Unterstützung durch zahlreiche Diskussionen, Anregungen, die Möglichkeit zur Teilnahme an Tagungen und Konferenzen danken. Meiner internen Betreuerin Dr. Larissa Müller danke ich für ihre freundliche Unterstützung und ihre stetige Bereitschaft sich mit mir den Kopf über offene Fragen und Probleme zu zerbrechen.

Für die Messungen am BESSY II, ihr Know-how, die ersten Verarbeitungen der Datensätze und ihre offenen Ohren für meine Fragen danke ich Dr. Heinrich Riesemeier, Dr. Uwe Reinholz, Dr. Martin Radtke, Dr. Günter Buzanich und Ralf Britzke.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Bürokollegen Fabian Börno, der mir fortwährend mit Rat und Tat zur Seite stand, immer neue Ideen hatte und mich durch nahezu tägliche Diskussionen zum Nachdenken anregte und auch dazu neue Wege auszuprobieren. Uwe Lindner danke ich für die fruchtbare und konstruktive Zusammenarbeit.

Die Mikrowellenaufschlüsse wurden durch die fachmännische Unterstützung von Sabine Buttler und Sybille Penk realisiert.

Andreas Schulz danke ich für seine uneingeschränkte Kompetenz und Hilfe bei der Untersuchung von wässrigen Proben und bei Problemen an den ICP-MS-Geräten.

Außerdem möchte ich mich bei dem von mir betreuten Praktikanten René Matschaß für sein Engagement, sein Interesse und die Vorbereitung der Wasserlinsenexperimente bedanken. Vielen Dank Katrin Kittler für die Starthilfe bezüglich der Zucht von Daphnien und deren Futteralgen.

Für die schöne Zeit an der BAM danke ich insbesondere Jonas Schenk, Frank Bierkandt, Matthias Balski, Benita Schmidt und Simone Hösl.

Petra Schubert danke ich für ihre freundliche Hilfsbereitschaft in allen bürokratischen Belangen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben.

4. Publikationsliste

4.1 Veröffentlichungen

J. Lingott, U. Lindner, L. Telgmann, D. Esteban-Fernández, N. Jakubowski, U. Panne, "Gadolinium-Uptake by Aquatic and Terrestrial Organisms – Distribution Determined by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry", *Processes and Impacts*, **2015**

U. Lindner, J. Lingott, S. Richter, W. Jiang, N. Jakubowski, U. Panne, „Analysis of gadolinium-based contrast agents in tap water with a new hydrophilic interaction chromatography (ZIC-chILIC) hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2015**, *407*, 2415-2422

U. Lindner, J. Lingott, N. Jakubowski, U. Panne, "Detection of Gadolinium - Contrast Agents in Surface Water and Plants", *Separation - Science & Applications*, **2014**, *34*, 20-23

U. Lindner, J. Lingott, N. Jakubowski, U. Panne , „Der Nachweis von Gadolinium – Kontrastmittel in Oberflächengewässern und Pflanzen", *GIT: Labor-Fachzeitschrift*, **2013**, *7*, 434-436

U. Lindner, J. Lingott, S. Richter, N. Jakubowski, U. Panne, "Speciation of gadolinium in surface water samples and plants by hydrophilic interaction chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2013**, *405*, 1865-1873

4.2 Tagungsbeiträge

4.2.1 Vorträge

1: J. Lingott, U. Lindner, H. Riesemeier, U. Reinholz, G. Buzanich, M. Radtke, F. Börno, N. Jakubowski, U. Panne, „Verteilung von Gadolinium aus MRT-Kontrastmitteln in biologischen Proben“, Forum Junger Umweltwissenschaftler, 27. – 29.05.2013, Blomberg (North Rhine-Westphalia), Germany

4.2.2 Poster

5: J. Lingott, H. Riesemeier, U. Reinholz, G. Buzanich, M. Radtke, N. Jakubowski, U. Panne, „Gadolinium-basierte MRT Kontrastmittel in biologischen Proben“, CANAS 2013 - Colloquium Analytische Atomspektroskopie, 17. – 19.03.2013, Freiberg, Germany

4: J. Lingott, H. Riesemeier, U. Reinholz, G. Buzanich, M. Radtke, N. Jakubowski, U. Panne, „Gadolinium-basierte MRT Kontrastmittel in biologischen Proben“, 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 10. – 13.03.2013, Berlin, Germany

3: U. Lindner, J. Lingott, S. Richter, N. Jakubowski, U. Panne, „HILIC-ICP-MS Speziation of Gadolinium containing contrast agents in surface water samples and plants“, 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 10. – 13.03.2013, Berlin, Germany

2: U. Lindner, J. Lingott, N. Jakubowski, U. Panne, S. Richter, „Speciation of Gadolinium in surface water samples and plants, analysed with HILIC-ICP-MS“, ICP-MS Anwendertreffen 2012, 10. – 12.09.2012, Tulln an der Donau, Austria

1: J. Lingott, H. Riesemeyer, U. Reinholz, G. Buzanich, M. Radtke, N. Jakubowski, U. Panne, „Gadolinium-based MRI Contrast Agents in Biological Samples“, 11th European Workshop on Laser Ablation (EWLA), 18. – 22.06.2011, Gijón, Spain

5. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass diese Arbeit in dieser oder anderer Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde. Der Inhalt der geltenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin vom 06. Juli 2009 ist mir bekannt.

Berlin, den 29. September 2015

Jana Lingott